

Maja Brkić

Ispitivanje bioadhezivnosti lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutika 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku tehnologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Anite Hafner.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Aniti Hafner na stručnom i savjesnom vođenju kroz proces izrade diplomskog rada te doc. dr. sc. Jasmini Lovrić i Marijeti Duvnjak Romić, mag. pharm., na pruženoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Ovim putem želim se također zahvaliti i svim svojim kolegama, prijateljima te mojoj obitelji. Posebna zahvala roditeljima koji su sa svojom podrškom i ljubavlju uvijek bili uz mene.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Oftalmička primjena lijekova.....	1
1.1.1. Barijere prednjeg segmenta oka	1
1.1.2. Barijere stražnjeg segmenta oka.....	3
1.1.3. Putovi permeacije lipofilnih i hidrofilnih lijekova kroz biološke barijere oka.....	5
1.2. Oftalmička primjena nanosustava	5
1.2.1. Vrste nanočestica	6
1.2.2. Prva generacija nanočestica	7
1.2.3. Druga generacija nanočestica	8
1.2.4. Treća generacija nanočestica	8
1.3. Kitozan-biopolimer izbora.....	9
1.3.1. Kitozan kao polimer izbora u izradi terapijskih (nano)sustava za oftalmičku primjenu	10
1.4. Melatonin.....	13
1.4.1. Otkriće i sinteza melatonina	13
1.4.2. Mehanizam djelovanja melatonina.....	14
1.4.3. Primjena melatonina.....	15
1.4.4. Primjena melatonina u liječenju glaukoma	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME	19
3. MATERIJALI I METODE.....	21
3.1. Materijali.....	21
3.2. Metode	21
3.2.1. Određivanje melatonina HPLC metodom	21
3.2.2. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom	22
3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina u nanočestice	22
3.2.4. Određivanje veličine nanočestica.....	24
3.2.5. Određivanje zeta-potencijala nanočestica	24
3.2.6. Stanična linija i uvjeti uzgoja	25
3.2.7. Ispitivanje bioadhezivnosti nanočestica	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27

4.1.	Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom.....	27
4.2.	Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice.....	28
4.3.	Veličina i zeta-potencijal nanočestica s melatoninom	29
4.4.	Bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica	30
5.	ZAKLJUČCI.....	33
6.	LITERATURA.....	34
7.	SAŽETAK	39
8.	SUMMARY	40

1. UVOD

1.1. Oftalmička primjena lijekova

Oko je organ vida koji je podložan brojnim bolestima od kojih neke mogu dovesti do trajnog gubitka vida. S ciljem unaprjeđenja liječenja bolesti oka, desetljećima se istražuju različiti terapijski sustavi prikladni za oftalmičku primjenu. Jedan od njih su nanočestice koje će biti opisane u ovom radu, a predstavljaju nosače koji mogu povećati permeabilnost lijeka kroz biološke barijere oka te posljedično njegovu bioraspoloživost u oku.

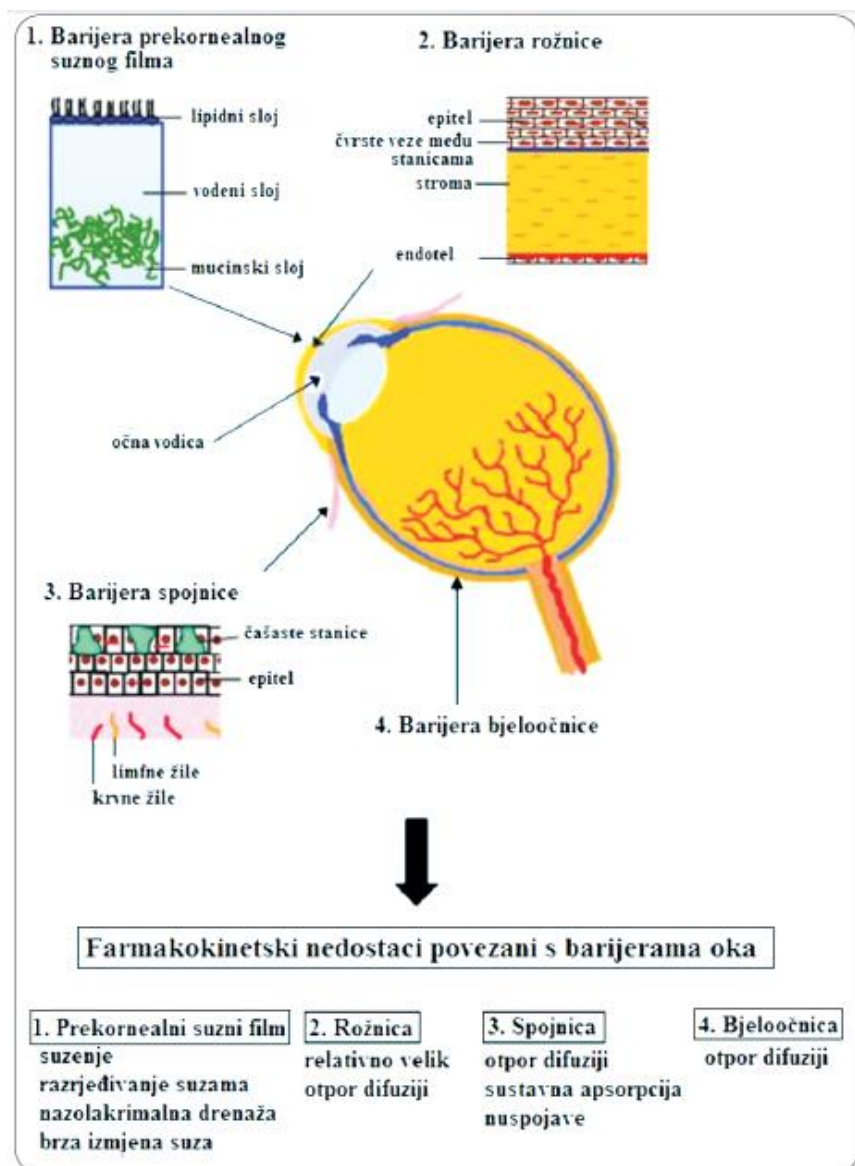
Naime, terapijska koncentracija lijeka na ciljnom mjestu u oku u potrebnom trajanju, teško se postiže zbog specifične anatomske građe oka i zaštitnih fizioloških mehanizama koji sinergistički ograničavaju bioraspoloživost lijeka u oku.

1.1.1. Barijere prednjeg segmenta oka

Lokalna primjena lijeka na površinu oka prvi je izbor u farmakoterapiji bolesti oka, i najbolje je prihvaćena od strane pacijenta. No, oko je djelomično izolirana struktura koja sadrži nekoliko fizioloških barijera koje su smještene na prednjem i stražnjem segmentu oka, a sprječavaju prijenos lijeka do ciljnog mjesta te smanjuju njegovu apsorpciju. Prvu barijeru oka predstavljaju fiziološki procesi treptanja i suzne drenaže. Treptanjem se odstranjuje višak volumena primijenjenog lijeka, a ostatak tog volumena se uz pomoć suzne tekućine ubrzo drenira u nazolakrimalni kanal te time primijenjena doza lijeka postaje manja od terapijske doze i apsorbira se u sistemsku cirkulaciju putem okolnih ekstraorbitalnih tkiva. Opisanim procesima smanjuje se vrijeme zadržavanja primijenjenog lijeka na mjestu apsorpcije, što u konačnici može dovesti do uklanjanja lijeka s površine oka za manje od 30 sekundi (Kaur i Kanwar, 2002.).

Suzni film koji prekriva površinu oka sastoji se od lipidnog, vodenog i mucinskog sloja u koji se izlučuju vrčaste stanice spojnice. Suzni film ima višestruku ulogu jer hidratizira, čisti, podmazuje i služi kao obrana od uzročnika bolesti, što uključuje dodatnu prepreku permeaciji lijeka (Le Boulrais i sur., 1998.). Štoviše, suzni film je dinamična tekućina koja potiče stalnu obnovu površine oka i stoga ograničava vrijeme zadržavanja lijeka na površini. Navedeni procesi zajedno čine barijeru prekornealnog suznog filma.

Glavne barijere prednjeg segmenta oka predstavljaju rožnica i spojnica. Rožnica je nevaskularna barijera koja se sastoji od pet do sedam slojeva, koji pridonose visokoj otpornosti pasivnoj difuziji iona i molekula. Tkivo rožnice se sastoji od epitela, u kojem su stanice povezane čvrstim vezama i dezmosomima, zatim strome i endotela. S obzirom na takvu strukturu, rožnica je gotovo nepropusna za tvari molekulske mase veće od 500 Da (Hämäläinen i sur., 1997.). Lipofilni epitel rožnice je višeslojan (5–6 slojeva u sredini; 8–10 slojeva prema periferiji) i građen od tijesno priljubljenih skvamoznih stanica.



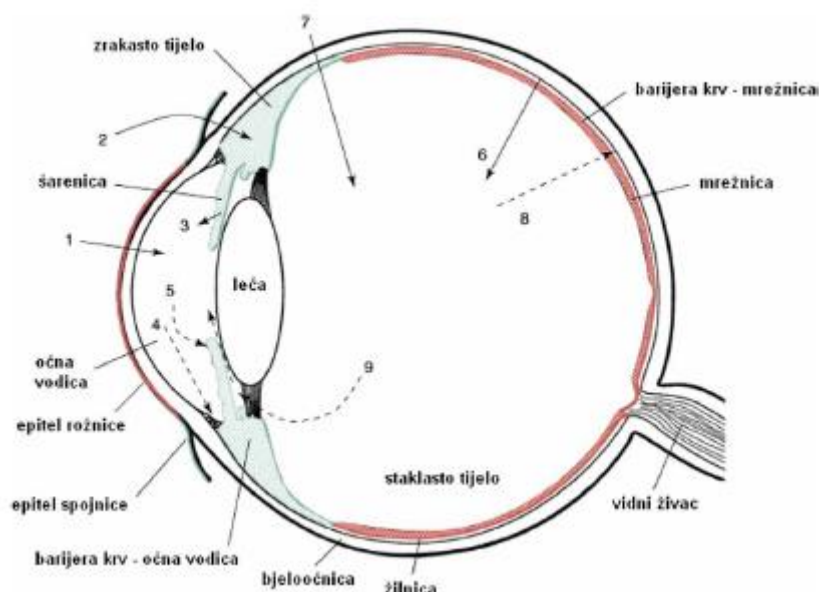
Slika 1. Barijere prednjeg segmenta oka (Pepić i sur., 2011.)

Hidrofilna stroma rožnice sastoji se od vlakana kolagena te stanica fibrocita i keratinocita bez kontinuirane strukture. Unutrašnji lipofilni endotel građen je od jednog reda skvamoznih ili kubičnih stanica bogatih mitohondrijima koje su odgovorne za regulaciju protoka tekućine i hranjivih tvari između očne vodice i strome rožnice. Druga barijera, smještena na prednjem segmentu oka je spojnica. Glavna uloga spojnice je zaštitna, a služi i kao pasivna fizička barijera. Građena je od epitela i strome. Epitel je višeslojan (5–15 slojeva stanica) i cilindričan, prekriven mikrovilima, te ima vrčaste stanice koje izlučuju sluz (mucus). Stroma spojnice sadrži krvne i limfne žile, živce, žlijezde i njihove izvodne kanale. Ukoliko lijek dođe do tog sloja moguća je sistemska apsorpcija i razvoj sistemskih nuspojava. Bjeloočnica je također još jedna očna barijera koja pruža visok stupanj otpora difuziji. Građena je od gustih kolagenskih i pojedinih elastičnih vlakana, proteoglikana, proteina, stanica i vode.

1.1.2. Barijere stražnjeg segmenta oka

Lijek koji je primijenjen sistemski ili periokularno, dospijeva do barijera na stražnjem segmentu oka. To su zapravo fiziološke barijere koje sprječavaju ulazak štetnih tvari i proteina iz sistemske cirkulacije u očnu vodicu i staklasto tijelo i tako održavaju njihovu providnost. Također imaju ulogu fizičkih barijera jer čine prepreku između krvi i tkiva oka. Razlikujemo dvije vrste takvih barijera: krv-očna vodica i krv-mrežnica (Pepić i sur., 2012.). Barijera krv – očna vodica sastoji se od epitela, krvnih žila šarenice i endotela krvnih žila srednje očne ovojnice, a njezina uloga pri fiziološkim uvjetima je održavanje sastava očne vodice sprječavajući prijenos tvari i makromolekula iz sistemske cirkulacije u očnu vodicu. Također, utječe na metabolizam rožnice i leće te pomaže u regulaciji volumena tekućina prisutnih u oku. Druga barijera stražnjeg segmenta oka, krv-mrežnica, sprječava ulazak stranih tvari iz kapilara žilnice u mrežnicu. Ova barijera podijeljena je na dvije cjeline: unutrašnju koju čini endotelna membrana krvnih žila, i vanjsku koju čini pigmentni epitel mrežnice na površini mrežnice prema žilnici. Pigmentni epitel mrežnice sastavljen je od tijesno priljubljenih stanica koje su gusto zbijene i čvrsto povezane te reguliraju transepitelni prijenos tvari. Ovaj specifični prijenos tvari osiguran je apikalnim čvrstim međustaničnim vezama koje reguliraju difuziju tvari kroz paracelularne prostore i asimetričnom raspodjelom proteinskih nosača koji reguliraju olakšanu difuziju. Dodatna uloga pigmentnog epitela mrežnice je eksprimiranje efluksnih nosača koji sprječavaju ulazak stranih tvari u mrežnicu te tako sprječavaju apsorpciju lijekova. Također zbog nabrojanih svojstava ove barijere, može

doći do sprječavanja eliminacije intravitrealno primijenjenog lijeka (Del Amo i sur., 2008.; Urtti, 2006.).



Slika 2. Shematski prikaz farmakokinetičkih procesa u oku: (1) transkornealna apsorpcija iz suzne tekućine u prednju očnu sobicu – glavni put apsorpcije klinički značajnih oftalmika, (2) nekornealna apsorpcija kroz spojnicu i bjeloočnicu do prednje očne sobice preko difuzije kroz zrakasto tijelo– makromolekulski i/ili hidrofilni lijekovi, (3) raspodjela lijeka iz sistemske cirkulacije u prednju očnu sobicu difuzijom iz krvnih žila šarenice preko barijere krv – očna vodica – male molekule, (4) eliminacija lijeka iz prednje očne sobice u sistemske cirkulacije izmjenom očne vodice kroz mrežu trabekula i Schlemmov kanal, (5) eliminacija lijeka iz očne vodice u sistemske cirkulacije difuzijom kroz površinu šarenice do uveoskleralnog krvožilnog sustava, (6) raspodjela lijeka iz sistemske cirkulacije u stražnji dio oka preko barijere krv – mrežnica (kroz pigmentni epitel mrežnice ili kroz endotel krvnih žila mrežnice), (7) intravitrealna primjena lijeka, (8) eliminacija lijeka iz staklastog tijela u sistemske cirkulacije preko barijere krv – mrežnica, (9) eliminacija lijeka iz staklastog tijela u sistemske cirkulacije difuzijom u prednju očnu sobicu (Pepić i sur., 2012.)

Osim nabrojanih barijera, očna tkiva sadrže metaboličke enzime kao što su esteraze i aldehid reduktaze. Oni mogu ubrzati razgradnju lijeka te smanjiti njegovo djelovanje (Duvvuri i sur., 2004.).

1.1.3. Putovi permeacije lipofilnih i hidrofilnih lijekova kroz biološke barijere oka

Nakon lokalne primjene na površinu oka, permeacija lijeka može se odvijati kroz rožnicu ili spojnicu, a ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima lijeka. Rožnica je heterogena barijera sastavljena od epitela (hidrofilna barijera), strome (lipofilna barijera) i endotela (blago lipofilan). Zbog svoje građe, rožnica predstavlja glavni put prijenosa za lipofilne lijekove (Gukasyan i Lee 2008.; Hosoya i Lee, 2005.; Jarvinen i sur., 1995.). Lipofilni lijekovi mogu lagano proći kroz epitel rožnice transcelularno ili olakšanom difuzijom kroz lipidni dvosloj (I. Ahmed i sur., 1987.). Prijenos lijeka preko strome otežan je hidrofilnom prirodom nove barijere i to predstavlja kritični korak za prolaz lijeka do unutrašnjosti oka. U stromi se lipofilan lijek zadržava te ona može predstavljati rezervoar iz kojeg će se lijek produženo oslobađati. Na kraju, endotel koji je građen od tankog sloja stanica, ne predstavlja značajnu barijeru. Spojnica je propusnija pa se očekuje da ona ima veću permeabilnost za velike hidrofilne molekule koje se transportiraju paracelularno. Paracelularni transport preko epitela rožnice moguć je samo za hidrofilne lijekove male molekulske mase, s obzirom da čvrste veze među stanicama reguliraju prienos hidrofilnih i/ili makromolekulskih tvari preko epitela rožnice (Ghate i Edelhauser, 2006.).

1.2. Oftalmička primjena nanosustava

Više od 90% lijekovitih pripravaka na tržištu namijenjenih liječenju bolesti oka oblikovani su kao konvencionalne kapi za oko. Oftalmičkim pripravcima oblika kapi pripadaju vodene ili uljne otopine i vodene ili uljne suspenzije. Primjenjuju se kapanjem na rožnicu ili u donju konjunktivalnu vrećicu radi liječenja oboljenja prednjeg segmenta oka (npr. konjunktivitis, sindrom suhog oka, glaukom) (Le Boulais i sur., 1998.).

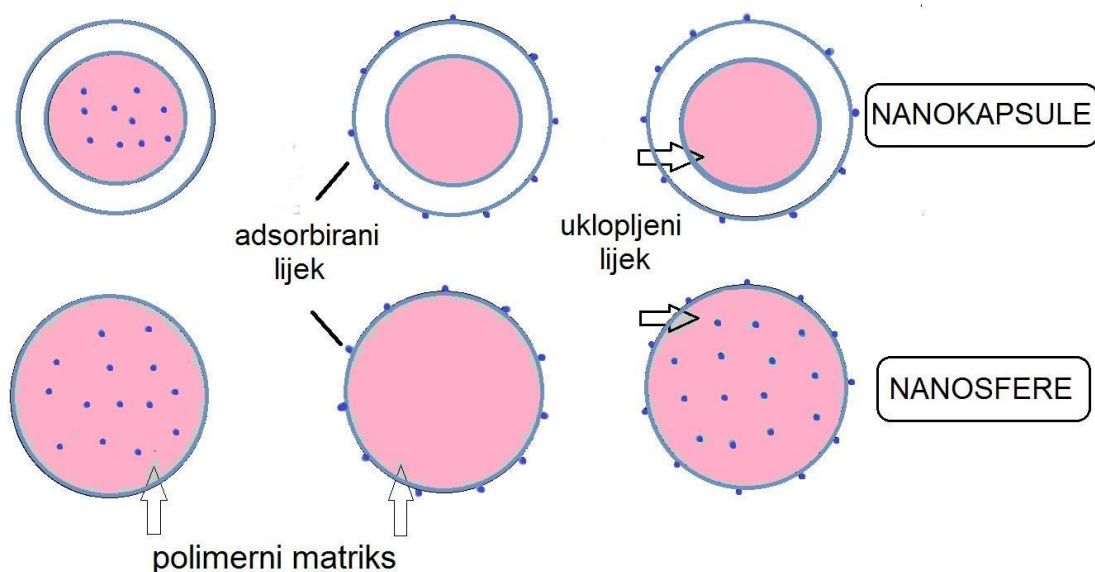
Vrlo često primjena oftalmičkih pripravaka ne rezultira željenim terapijskim učincima i ograničena je zaštitnim fiziološkim mehanizmima uklanjanja stranih tvari s površine oka te učinkovitom barijerom površine oka. Posljedica toga je loša biološka raspoloživost lijeka iz oftalmičkih otopina, suspenzija, hidrogelova i masti. Ipak, u današnje se vrijeme najviše primjenjuju u nedostatku boljih i primjerenijih rješenja (Pepić, 2009.).

Cilj suvremenih istraživanja terapijskih sustava za lokalnu oftalmičku primjenu je produljiti kontakt sustava s površinom oka, kontrolirati kinetiku oslobađanja lijeka iz sustava i poboljšati bioraspoloživost lijeka u oku. Brojni su terapijski sustavi razvijani kako bi unaprijedili farmakokinetička svojstva oftalmičkih lijekova, kao npr. sustavi koji stvaraju gel fazu pri dodiru s površinom oka, bioadhezivni sustavi, nanočestice, umeci, meke kontaktne leće (Pepić, 2009.).

Nanosustavi u oftalmologiji su inovativni sustavi čije prednosti se još razotkrivaju. Mogu se primijeniti lokalno i intraokularno (subkonjuktivalno, intravitrealno). Imaju brojna korisna svojstva zahvaljujući kojima nanočestice mogu poboljšati dostavu lijeka do ciljanog mjesta u oku. Neke od već dokazanih prednosti primjene nanočestica kao nosača oftalmičkih lijekova su poboljšani transport velikih, u vodi slabo topljivih molekula (poput ciklosporina), te velikih i nestabilnih molekula, kao što su nukleinske kiseline, čime se postižu obećavajući rezultati u genskoj terapiji, kod teških bolesti mrežnice. Također je dokazano da se primjenom nanočestica kao nosača lijekova, postiže dulje vrijeme kontakta s ciljnim tkivom. Razvoj nanotehnologije praćen je razvojem brojnih vrsta nanočestica koje se razlikuju u materijalu od kojeg su napravljene, dizajnu, naboju, veličini te brojnim drugim fizičko-kemijskim svojstvima. Navedena svojstva, kao i ciljno tkivo, odrediti će mogući internalizacijski put i unutarstaničnu sudbinu nanočestica.

1.2.1. Vrste nanočestica

Nanočestice kao terapijski sustavi međusobno se razlikuju prema građi i načinu uklapanja lijeka. Tako se pod pojmom nanočestica podrazumijevaju i nanosfere i nanokapsule. Nanosfere su matriksni sustavi u kojima je lijek jednoliko dispergirani ili je adsorbiran na njihovoj površini. Nanokapsule su vezikularni sustavi kod kojih se može razlikovati unutrašnjost ili jezgra čestice od vanjske polimerne ovojnice. Kod takvih sustava lijek je obično otopljen u samoj jezgri čestice, ali može biti i adsorbiran na površini čestice (Alonso i Sanchez, 2006.).



Slika 3. Prikaz uklopljenog lijeka u nanočestice (Pepić i sur., 2011.)

Nanočestice mogu biti obložene hidrofilnim polimerima ili funkcionalnim antitijelima koji omogućuju dostavu lijeka na ciljno mjesto djelovanja.

1.2.2. Prva generacija nanočestica

1981. prvi put su predložene nanočestice i, u usporedbi s vodenim otopinama polimera, uočene su značajne prednosti (Garny, 1981.). U brojnim istraživanjima ispitivana je mogućnost primjene različitih polimera u izradi nanočestica kao terapijskih sustava za oftalmičku primjenu, a to su: akrilni polimeri (poli(alkilcijanoakrilati)), poliesteri, tj. poli-ε-kaprolakton i polisaharidi, kao što su hijaluronska kiselina i kitozan. Prve nanočestice građene su od akrilnih polimera (polialkilcijanoakrilata (PACA)), te je postignuto produljeno oslobađanje lijeka u prekornealnom području. Uz to, zabilježeno je i produljeno zadržavanje sustava na površini oka, te je posljedično povećan ili produljen farmakološki učinak. Nakon što je utvrđena okularna toksičnost PACA polimera, u izradi nanočestica za oftalmičku primjenu korišten je poliakrilamid. Nanosfere građene od poliakrilamida s uklopljenim epinefrinom produljile su smanjenje intraokularnog tlaka (Pignatello i sur., 2002.). Nanočestice građene od poliestera (poli-ε-kaprolaktone i kopolimera mliječne i glikolne kiseline) dobro su podnošljive u oku (Giannavola i sur., 2003.). Primjer je betaksolol

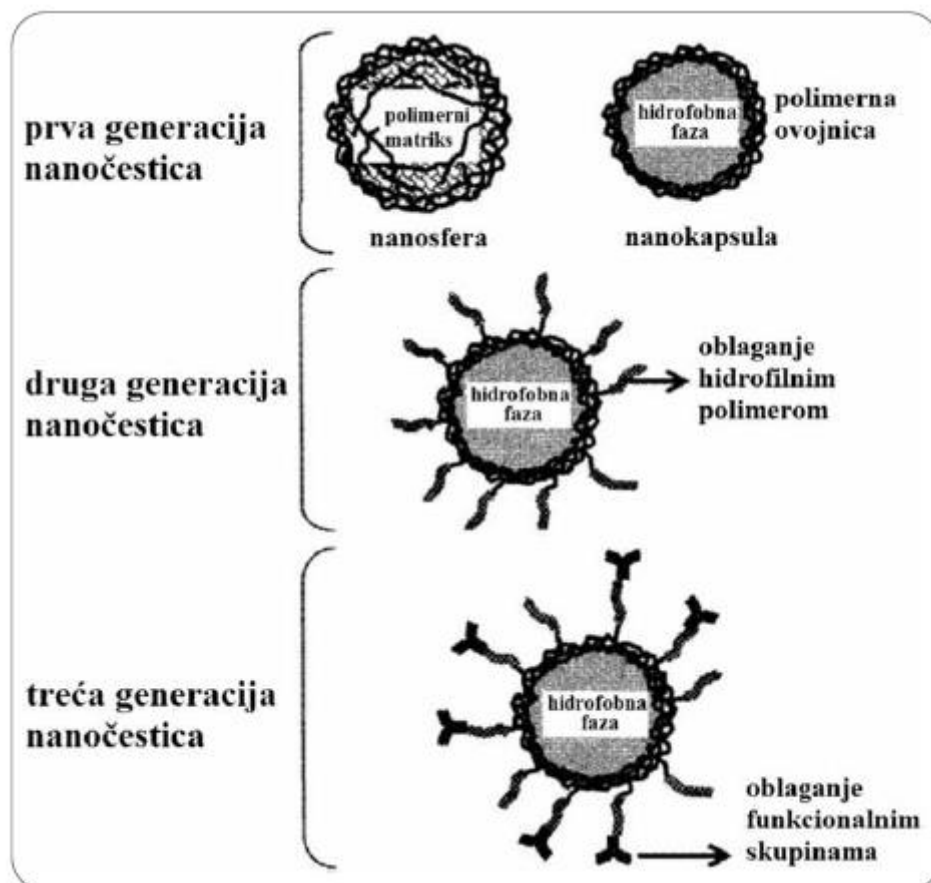
uklopljen u poli- ϵ -kaprolakton koji postiže optimalan farmakološki učinak zbog nakupljanja hidrofobnih nanočestica u spojničkoj vrećici te postupnim oslobađanjem betaksolola. Nanočestice građene od hidrofilnih polisaharida, hijaluronske kiseline i kitozana, vrlo su sigurne za oftalmičku primjenu. Hijaluronska kiselina je biorazgradiva te je osnovna sastavnica staklastog tijela. Dokazano je pokusom produljeno zadržavanje lijeka na površini oka upotrebom otopine hijaluronske kiseline (Pepić i sur., 2011.).

1.2.3. Druga generacija nanočestica

Nakon što je dokazano da nanočestice prve generacije produljuju kontakt s površinom oka, sljedeći cilj bio je poboljšanje interakcije nanosustava s površinom oka. Poboljšanje interakcije nanočestica s rožnicom, prvi je izbor za lijekove s ciljnim mjestom učinka u unutarnjem segmentu oka, a poboljšana interakcija nanočestica sa spojnicom i kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka pružaju mogućnost liječenja bolesti vanjskog segmenta oka. Poboljšanje interakcije nanočestica s površinom oka moguće je postići oblaganjem izrađenih nanočestica polimernom ovojnicom. Najjednostavniji način izrade obloženih nanosustava je dispergiranje nanočestica u vodenoj otopini bioadhezivnih polimera. Prednosti obloženih nanosustava uključuju bolju permeabilnost uklopljenog lijeka (oblaganje PACA nanosfera poliakrilnim polimerom rezultiralo je boljom permeabilnošću uklopljenog ciklosporina A) te povećanje stabilnosti u suznoj tekućini (oblaganje nanočestica polietilenglikolom sprječava interakcije nanosustava i proteina (enzima)) (Pepić i sur., 2011.).

1.2.4. Treća generacija nanočestica

Treća generacija obuhvaća funkcionalne nanočestice s promijenjenim svojstvima površine. Naime, površinska svojstva se mijenjaju oblaganjem specifičnim funkcionalnim skupinama koje omogućuju usmjeravanje nanočestica do ciljnog mjesta u oku. Primjer je lektin, glikoprotein koji prepoznaje i veže se za specifične skupine ugljikohidrata smještene na površini epitelnih stanica rožnice, na spojnicu i sastavne dijelove prekornealnog suznog filma (Alonso i Sanchez, 2006.). Monoklonska protutijela također mogu poslužiti za izradu funkcionalnih nanočestica (Pepić i sur., 2011.).

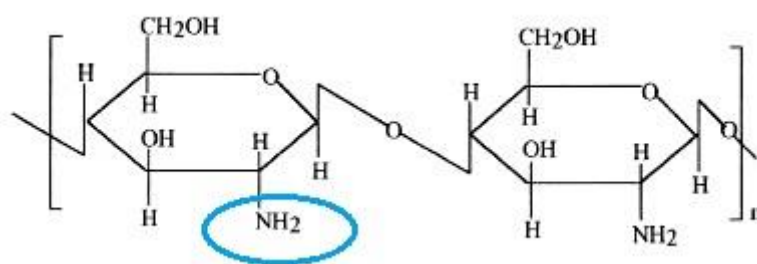


Slika 4. Shematski prikaz generacija nanočestica (Pepić i sur., 2011.)

1.3. Kitozan-biopolimer izbora

Kitozan je prirodni kationski polisaharid dobiven iz ljuštura člankonožaca. Derivat je hitina (deacetilirana forma) a obilježja su mu slična glikozaminoglikanu. Na tržištu se može pronaći u različitim oblicima, različite molarne mase, različitog stupnja deacetilacije i kao baza ili u obliku soli. To je kationski poliamin čija trodimenzionalna struktura odgovara α -heliksu, stabiliziranom unutarmolekulskim vodikovim vezama. Zbog gustoće naboja pri $\text{pH} < 6,5$, adherira na negativno nabijene površine, a s polianionima tvori gelove. Kitozan predstavlja različite deacetilirane forme hitina a njegova funkcionalna svojstva većinom ovise o duljini polimernog lanca te o gustoći i raspodjeli naboja. Molekulska masa kitozana može biti između 50 i 2000 kDa, a stupanj deacetilacije između 40 i 98 %. Kitozani s niskim stupnjem deacetilacije (40 %) topljivi su u kiselom, neutralnom i alkalnom mediju (do $\text{pH} < 9$), a kitozani s višim stupnjem deacetilacije topljivi su samo u kiselom mediju ($\text{pH} < 6,5$). U

farmaceutskoj industriji koriste se kitozani stupnja deacetilacije između 90 i 95 % (Illum, 1998.). Osim navedenih obilježja kitozana, potrebno je također spomenuti svojstva kao što su viskoznost, indeks kristaličnosti, broj monomernih jedinica, konstanta kiselosti i energija hidratacije (Kas, 1997.). Viskoznost kitozanskih otopina povezana je s molekulskom masom i stupnjem deacetilacije tako da što je više slobodnih amino-skupina u polimernom lancu, povećana je mogućnost nastajanja vodikovih veza što uzrokuje promjenu u konformaciji molekule i povećava se viskoznost kitozanske otopine (Illum, 1998.).



Slika 5. Kitozan - deacetilirani oblik hitina

1.3.1. Kitozan kao polimer izbora u izradi terapijskih (nano)sustava za oftalmičku primjenu

Dosadašnja istraživanja i razvoj oftalmičkih terapijskih nanosustava rezultirali su boljim kontaktom djelatne tvari sa strukturama oka, opsežnijim prolaskom preko bioloških barijera oka te duljim zadržavanjem na mjestu apsorpcije/djelovanja (de la Fuente i sur., 2010.). Kroz zadnje desetljeće intenzivno se razvijaju oftalmički terapijski nanosustavi temeljeni na kitozanu, koji odgovara zahtjevima za topikalnu oftalmičku primjenu lijeka. Kitozan predstavlja polimer izbora u razvoju oftalmičkih terapijskih sustava zahvaljujući svojstvima biokompatibilnosti, biorazgradljivosti te bioadhezivnosti. Bioadhezivnost kitozana uglavnom je posljedica elektrostatske interakcije pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih skupina bioloških struktura, no tom svojstvu pridonosi i formiranje vodikovih veza te hidrofobne interakcije. Doprinos spomenutih mehanizama bioadhezivnosti kitozana ovisi o pH te prisustvu drugih tvari u pripravku. Usto, kitozan djeluje i kao pospješivač apsorpcije preko epitela sluznice. Takav učinak pripisuje se reverzibilnom otvaranju međustaničnih čvrstih veza čime kitozan pospješuje paracelularni transport hidrofilnih djelatnih tvari. U nekim istraživanjima ističe se mogućnost utjecaja kitozana i na transcelularni put apsorpcije

djelatnih tvari (Smith i sur., 2004.; Smith i sur., 2005.). Također, otopine kitozana pokazuju pseudoplastična i viskoelastična svojstva što je bitno za okularnu primjenu lijekova. Naime, prekornealni suzni film ima pseudoplastični karakter koji se ne bi smio narušiti primjenom tekućih oftalmičkih pripravaka. Također, pseudoplastični pripravci lako se raspodjeljuju i dulje se zadržavaju na površini oka (Alonso i Sánchez, 2003.). Kitozanski sustavi karakterizirani su dobrom okularnom podnošljivošću, zahvaljujući niskoj toksičnosti i biorazgradljivosti, a nekim ispitivanjima utvrđena je čak i antibakterijska aktivnost tog polisaharida (Goy i sur., 2009.).

Utjecaj otopine kitozana na bioraspoloživost lijeka u oku zabilježen je u različitim ispitivanjima (de la Fuente i sur., 2010.). Prisustvo kitozana u otopinama za oftalmičku primjenu rezultiralo je duljim zadržavanjem pripravka u prekornealnom području. Također je utvrđena i povećana transkornealna permeacija ofloksacina u očnu vodicu u zečeva, u prisustvu kitozana (di Colo i sur., 2002.).

Drugi nedavno razvijani pristupi poboljšanju bioraspoloživosti topikalno primijenjenog lijeka u oku temelje se na derivatizaciji kitozana i kombinacijama s različitim polimerima sa svojstvom formiranja gela *in situ*. Gel koji nastaje pri kontaktu tekućeg pripravka s površinom oka dulje se zadržava na mjestu primjene i kontrolira oslobađanje djelatne tvari (Almeida i sur., 2014.).

U novije vrijeme razvijaju se različiti tipovi kitozanskih nanosustava, optimirani s obzirom na fizičko-kemijska svojstva uklopljene djelatne tvari kao što su hidrofilnost/lipofilnost te molekulska masa. Nakon što je utvrđeno povećanje bioraspoloživosti hidrofilnih djelatnih tvari male molekulske mase uklopljenih u kitozanske sustave, teži se razvijanju kitozanskih sustava koji će povećati bioraspoloživost lipofilnih djelatnih tvari te nestabilnih makromolekula poput proteina i nukleinskih kiselina. Trenutno je u literaturi opisano više vrsta kitozanskih nanostrukture koje imaju sposobnost uklapanja velikog raspona različitih molekula i zaštite istih u biološkom okruženju. Ovisno o njihovoj strukturi i sastavu, moguće je postići i kontrolirano oslobađanje uklopljenog lijeka na mjestu primjene. Pregled kitozanskih nanostrukture ukratko je prikazan u Tablici 1.

Tablica 1. Vrste kitozanskih nanosustava (de la Fuente i sur., 2010.)

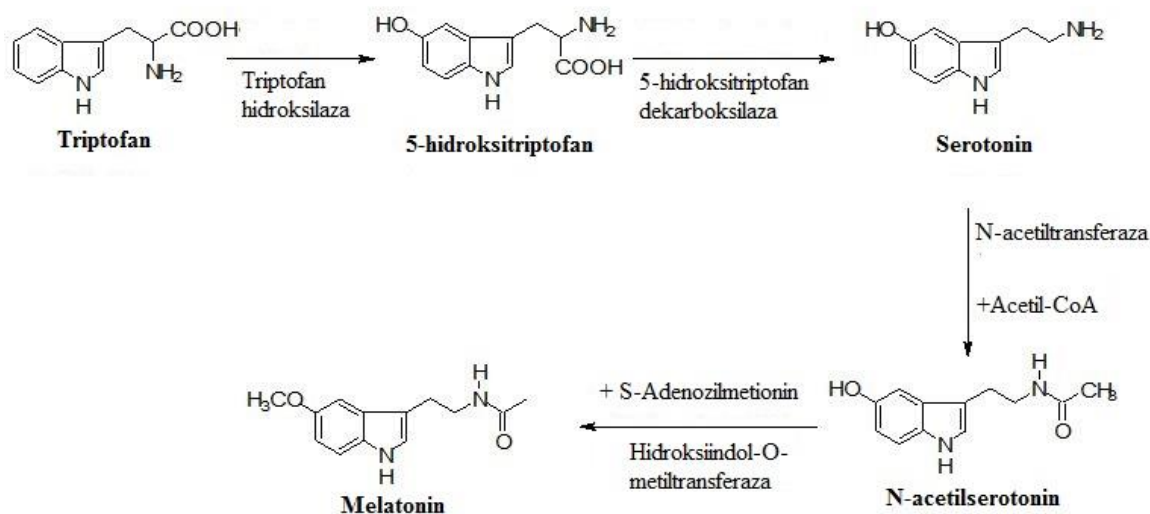
Kitozanski sustav	Djelatne tvari	Biodistribucija	Biokompatibilnost/toksičnost	Učinak <i>in vitro/in vivo</i>
nanoemulzije s kitozanom u vodenoj fazi (kitozanske nanokapsule)	Lipofilne djelatne tvari		Dobra podnošljivost nakon topikalne oftalmičke primjene u zečeva	Povećanje koncentracije indometacina u rožnici i očnoj vodici nakon topikalne primjene nanokapsula s indometacinom (u zečeva)
Nanosustavi obloženi kitozanom	Lipofilne djelatne tvari	Dobra interakcija sa sluznicom oka zahvaljujući intrizičnim svojstvima kitozana. Penetracija PECL nanokapsula obloženih kitozanom kroz rožnicu transcelularnim putem Produljeno zadržavanje PLA nanočestica obloženih kitozanom koji je kemijski modificiran kolesterolom, na površini oka	Dobra podnošljivost nakon topikalne oftalmičke primjene u zečeva	Povećanje koncentracije indometacina u rožnici i očnoj vodici nakon topikalne primjene nanokapsula s indometacinom (u zečeva) Povećanje preživljavanja presatka rožnice u zečeva nakon topikalne primjene nanočestica s rapamicinom
Kitozanske nanočestice	Lipofilne djelatne tvari, proteini, nukleinske kiseline	Bolja interakcija sa sluznicom oka (rožnicom ili konjuktivom) u odnosu na otopinu Permeacija kroz epitel rožnice transcelularnim putem Endocitoza u stanice spojnice	Mala toksičnost <i>in vitro</i> na stanice epitela spojnice Biokompatibilnost nakon akutne primjene u zečeva	Povećanje koncentracije ciklosporina A (CyA) u rožnici nakon topikalne primjene nanočestica s CyA Ekspresija proteina nakon inkubacije nanočestica kao nosača pDNA sa epitelnim stanicama rožnice i spojnice
Nanočestice nastale samoorganiziranjem kemijski modificiranog kitozana	Lipofilne djelatne tvari	Ravnomjerna raspodjela i produljeno zadržavanje nanočestica nastalih samoorganiziranjem kitozana modificiranog kolesterolom, nakon primjene na površinu oka		Povećanje koncentracije prednizolona u očnoj vodici nakon topikalne primjene nanočestica s prednizolonom
Nanočestice nastale interakcijom hijaluronske kiseline i kitozana	Hidrofilne i lipofilne djelatne tvari, proteini, nukleinske kiseline	Interakcija sa HA-receptorom CD44 koji je eksprimiran u okularnim staničnim linijama Izražena interakcija sa sluznicom oka	Vrlo mala toksičnost (manja nego kod kitozanskih nanočestica) ispitana <i>in vitro</i> na stanicama rožnice i spojnice Bez učinka na funkciju oka ili izazivanja iritacije nakon akutne primjene u zečeva	Produljena ekspresija proteina u rožnici nakon topikalne primjene nanočestica kao nosača pDNA u zečeva
Nanočestice nastale interakcijom kitozana i lipida	Lipofilne djelatne tvari, proteini	Specifična interakcija sa spojnicom nakon topikalne primjene	Dobra podnošljivost nakon topikalne primjene u zečeva	

1.4. Melatonin

Melatonin (*N*-acetil-5-metoksitriptamin) je neurohormon kojeg možemo pronaći u bakterijama, jednostaničnim eukariotima, algama, gljivama, biljkama, životinjama i ljudima (Tan i sur., 2010.). Sintetizira se prvenstveno u epifizi pa se stoga naziva hormonom epifize. Do danas, otkrivene su mu brojne funkcije, a najviše se povezuje s regulacijom cirkadijalnog ritma.

1.4.1. Otkriće i sinteza melatonina

Iako se njegova sposobnost da posvjetljuje kožu punoglavaca znala još od 1917., melatonin je prvi puta izoliran 1958.g. iz ekstrakta goveđe epifize te je strukturno okarakteriziran. Primarno se sintetizira i izlučuje iz pinealocita (stanice epifize) ali možemo ga naći i u koštanoj srži, limfocitima, trombocitima, koži, mrežnici te stanicama probavnog sustava. Sinteza se odvija većinom tijekom noći dok je preko dana suprimirana (Pavić i Zorc, 2013.). Melatonin je po kemijskom sastavu indolamin, a nastaje iz aminokiseline triptofan.



Slika 6. Sinteza melatonina sastoji se od 4 koraka: 1. Hidroksilacija L-triptofana 2. karboksilacija uz dekarboksilazu aromatskih aminokiselina 3. N-acetilacija serotoninina 4. O-metilacija acetiliranog serotoninina u melatonin (www.intechopen.com)

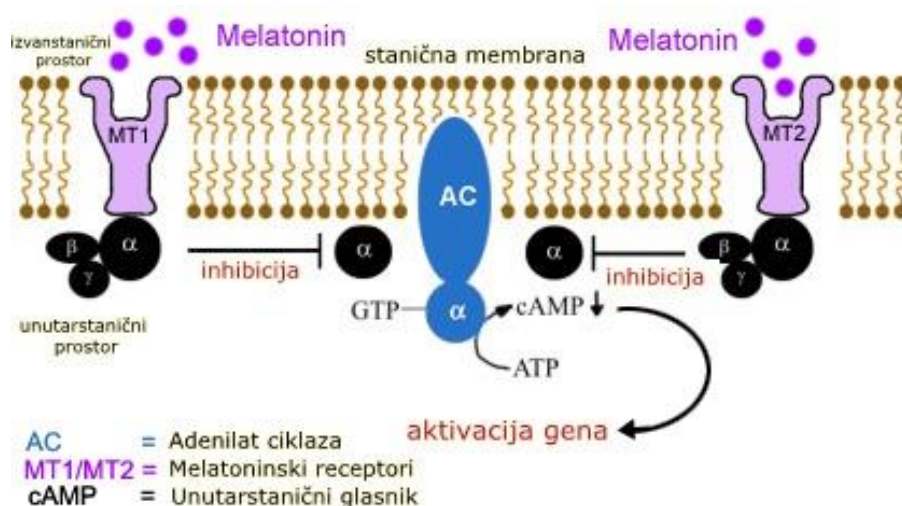
Nakon što je sintetiziran, melatonin se ne pohranjuje u pinealocitima, nego difuzijom prelazi u kapilarni sustav i cerebrospinalnu tekućinu te brzo dopire do svih tkiva i tjelesnih

tekućina što dokazuje i njegova prisutnost u krvi, urinu, spermi i majčinom mlijeku. Metabolizira se većinom u jetri uz enzime citokrom P450 ali moguće je i neenzimski, djelovanjem slobodnih radikala i drugih oksidansa pri čemu nastaje ciklički 3-hidroksimelatonin koji ima sposobnost izravnog hvatanja dva hidroksilna radikala (Chowdhury i sur., 2008.).

1.4.2. Mehanizam djelovanja melatonina

S obzirom da se melatonin nalazi gotovo u svakoj stanici organizma, njegov učinak je itekako vidljiv. Na staničnoj razini može djelovati putem četiri mehanizma:

- 1) Vezanje za membranske melatoninske receptore (MT1, MT2, MT3)- MT1 i MT2 receptori su široko rasprostranjeni u središnjem živčanom sustavu te su to receptori spregnuti G-proteinom. Vezanjem melatonina dolazi do inhibicije adenilat ciklaze i stvaranja cGMP-a što uzrokuje promjenu u staničnom signaliziranju. Dolazi do faznog pomaka endogenog sata u jezgri središnjeg živčanog sustava tj. pospanosti. MT3 receptor je zapravo enzim kinon reduktaza 2 koji sudjeluje u zaštiti od oksidativnog stresa. Važan je i za ulazak stanice u S i M fazu staničnog ciklusa te sudjeluje u regulaciji intraokularnog tlaka (Guyton i Hall, 2006.).



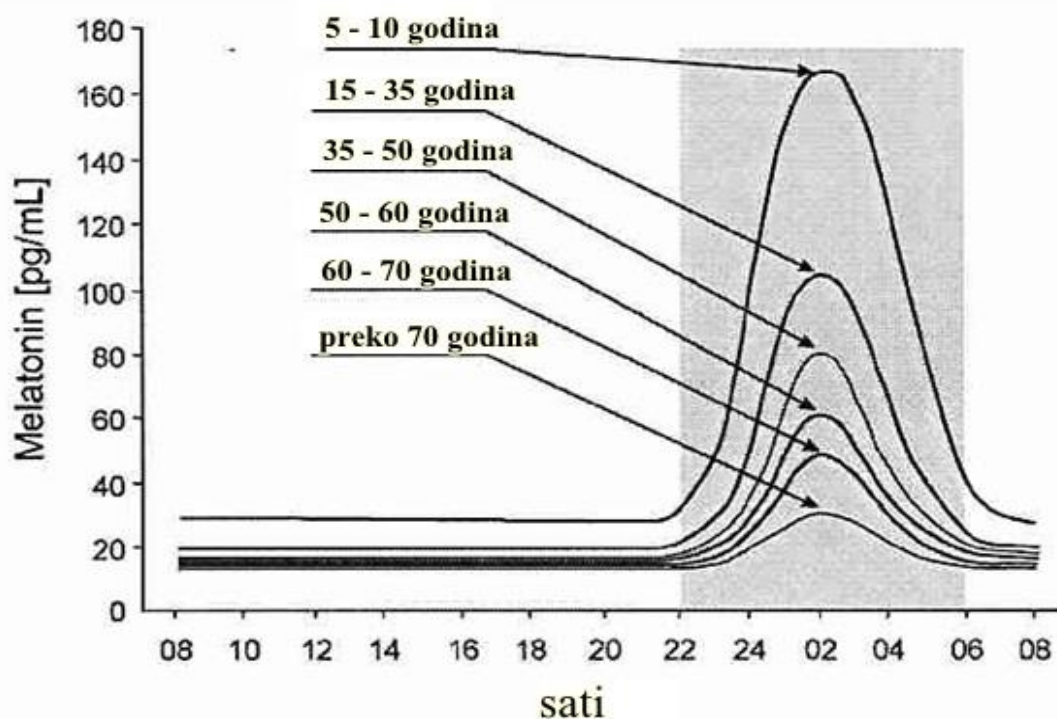
Slika 7. Djelovanje melatonina na MT receptore

- 2) Vezanje na nuklearne orphan receptore za retinoičnu kiselinu. Podtipovi tih receptora sudjeluju u regulaciji cirkadijalnog ritma i imunosti.

- 3) Interakcija s unutarstaničnim proteinom kalmodulinom te antagoniziranje vezanja kalcija za taj protein.
- 4) Antioksidativni mehanizam djelovanjem na receptore, ili nerekceptorski, izravnim vezanjem slobodnih radikala ili izmjena elektrona u respiratornom lancu.

1.4.3. Primjena melatonina

Kao što je već navedeno, melatonin ima brojna djelovanja od kojih je najistaknutije regulacija cirkadijalnog ritma tj. ciklus spavanja i budnosti. Tama pospješuje njegovu sintezu i sekreciju pa tako što je dulja noć, dulja je i njegova sekrecija. On je tzv. somnogen, tj. tvar koja potiče spavanje. Produljuje REM fazu sna, povećava sekreciju kortizola, te smanjuje tjelesnu temperaturu, što dovodi do uspavljivanja. Prva indikacija pri kojoj se danas koristi je poremećaj dnevnog bioritma uslijed promjene vremenskih zona (*jet lag*) ali koristi se i u osoba koje rade noćne smjene i u slijepih ljudi u kojih sinteza melatonina nije regulirana izmjenom ciklusa svjetlo/tama. Koristi se kod kronične primarne nesanice, narkolepsije ili poremećaja spavanja u djece s ADHD-om. Starenjem opada razina melatonina te kvaliteta sna, pa se razmatra primjena melatonina u starijih ljudi (Pandi-Perumal i sur., 2006.).



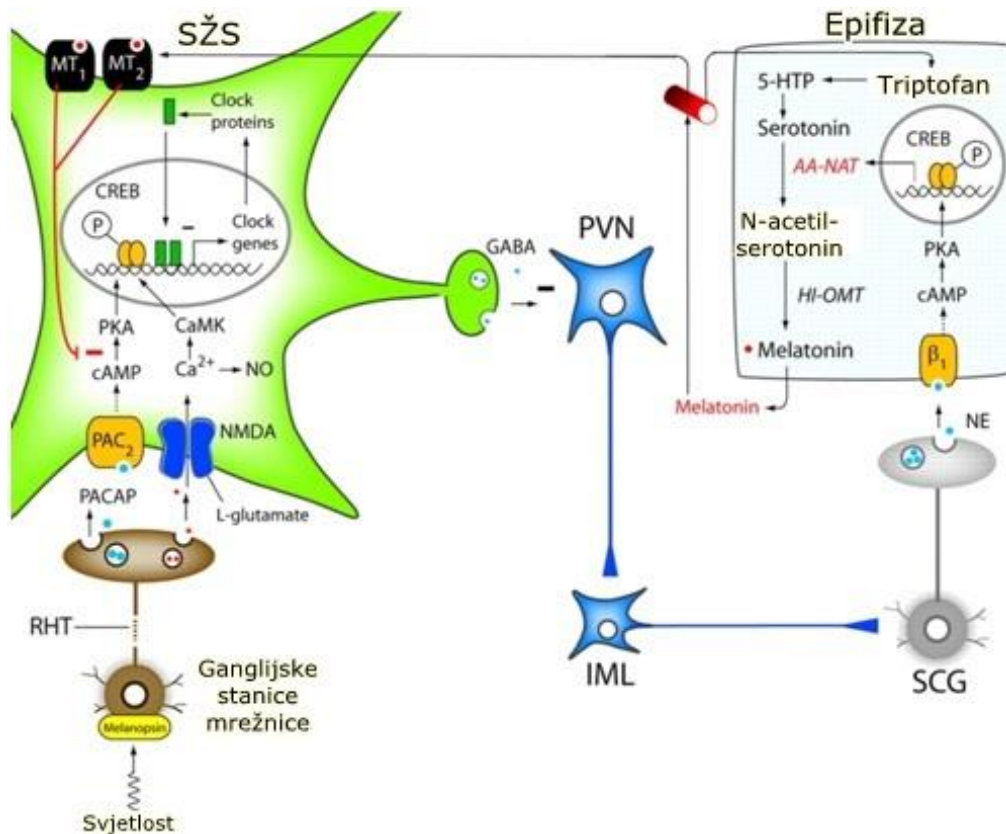
Slika 8. Prikaz ovisnosti koncentracije melatonina u krvi o dobu dana, te smanjenje koncentracije melatonina u krvi starenjem

Kao što je već spomenuto, melatonin ima jako antioksidativno djelovanje te je jači antioksidans od vitamina C i E (Chowdhury i sur., 2008.). Njegovo antioksidativno djelovanje očituje se zaštitinim učinkom na želudac te se može koristiti kao dodatna terapija kod vrijeda dvanaesnika. Dokazano je i njegovo imunostimulativno djelovanje. U nekim slučajevima dolazi do međudjelovanja epifize i imunološkog sustava koje je dvosmjerno jer melatonin potiče stvaranje citokina i interleukina, a oni potiču sintezu i sekreciju melatonina. Melatonin je učinkovit u snižavanju sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka u bolesnika s hipertenzijom. Vezanje melatonina na MT2 receptore uzrokuje vazodilataciju te smanjuje arterijski puls i otpor, no međutim s druge strane melatonin uzrokuje i vazokonstrikciju vežući se na MT1 receptore. Djeluje na arterijski krvni tlak i preko autonomnog živčanog sustava, stoga primjena egzogenog melatonina povećava tonus vagusa i smanjuje koncentraciju noradrenalina u cirkulaciji (Pandi-Perumal i sur., 2008.). Također, melatonin utječe na sintezu, sekreciju i djelovanje steroidnih i nesteroidnih hormona. Djeluje na sintezu hormona rasta, tireotropina i adrenokortikotropina izravno preko hipofize ili neizravno preko hipotalamusa. Utječe na metabolizam kalcija i fosfora preko paratireoidnih žlijezda i na periferne učinke kortikosteroida preko hipofizno-adrenalne osi. Zbog inhibicije osi hipotalamus-hipofiza-gonade, melatonin ima jak utjecaj na reprodukciju sisavaca koji se pare sezonski, ali i ljudi. S obzirom da melatonin stimulira sekreciju progesterona, koja posljedično uzrokuje inhibiciju sekrecije gonadotropin otpuštajućeg hormona (GnRH), koji je uključen u propadanje žutog tijela, razmatra se njegova moguća primjena za održavanje žutog tijela u trudnoći. Brojnim ispitivanjima utvrđeno je i njegovo antitumorsko djelovanje, i to na više razina, te također poboljšava učinkovitost kemoterapije i smanjuje nuspojave citostatika. Pri brojnim psihičkim poremećajima dolazi do promjene u sekreciji melatonina, koja je najčešće smanjena. Danas se još uvijek istražuje njegova uloga i mehanizmi kojim djeluje kod takvih poremećaja (Pavić i Zorc, 2013.).

1.4.4. Primjena melatonina u liječenju glaukoma

Glaukom je progresivna bolest okularnog živca i jedan od vodećih uzroka sljepoće u razvijenim zemljama. Povećani intraokularni tlak, kao posljedica smanjenog otjecanja očne vodice, predstavlja glavni čimbenik rizika za razvoj glaukoma. Epidemiološkim ispitivanjima pokazano je da rizik od glaukoma raste za 12 % uslijed porasta intraokularnog tlaka od 1 mm

Hg (Nemesure i sur., 2007.). Lijekovi koji se primjenjuju topikalno pri liječenju glaukoma mogu se svrstati u 5 glavnih skupina; To su derivati prostaglandina, beta-blokatori, inhibitori karboanhidraze, simpatomimetici i miotici. Usprkos relativno velikom izboru lijekova, još uvijek postoji potreba za potentnijim lijekovima u liječenju glaukoma. U posljednje vrijeme je velika pozornost usmjerena na melatonin kao novi potencijalni lijek u liječenju glaukoma (Alcantara- Contreras i sur., 2011.). Osim što se sintetizira u pinealnoj žlijezdi, melatonin se sintetizira i u oku sisavaca, pa tako i u ljudi (Lundmark i sur., 2007.). Jednako kao i u pinealnoj žlijezdi, melatonin u oku sintetizira se ovisno o ritmu izmjene dana i noći, pa se vršne koncentracije postižu tijekom noći. Poznato je da se intraokularni tlak također mijenja tijekom dana; najveće vrijednosti bilježe se tijekom dana, a najmanje tijekom noći, kada se razina melatonina povećava. To zapažanje poslužilo je kao osnova za postavljanje hipoteze vezane uz utjecaj melatonina na ritam izmjene intraokularnog tlaka. U sisavaca su pronađena dva podtipa receptora melatonina, MT1 i MT2 receptori, koji su kodirani MTNR1A i MTNR1B genima. Receptori melatonina pronađeni su u cilijarnom tijelu. Utvrđeno je da melatonin i neki derivati melatonina smanjuju intraokularni tlak u nekoliko vrsta (Agorastos i Huber, 2011.). Nedavno su Alcantara-Contreras i suradnici (2011.) u ispitivanju provedenom u miševa pokazali da je smanjenje intraokularnog tlaka posredovano MT1 receptorima. Također je kao jedan od mehanizama djelovanja melatonina na intraokularni tlak predložen i utjecaj na stvaranje očne vodice (Bucolo i sur., 2013.).



Slika 9. Kaskada događaja u ciklusu sinteze i djelovanja melatonina (AA-NAT – arilalkilamin N-acetiltransferaza; cAMP – ciklički adenzin monofosfat; CaMK – Kalcij/kalmodulin ovisna protein kinaza; CREB – protein koji veže elemente odgovora na cAMP; GABA – γ -aminomaslačna kiselina; HI-OMT – hidroksiindol-O-metil transferaza; HTP – hidroksitriptofan; IML – intermediolateralna stanična zona; MT – melatoninski receptor; NMDA – N-metil-D-aspartat; NO – dušikov oksid; PAC – hipofizna adenilat ciklaza; PACAP – hipofizna adenilat ciklaza-aktivirajući polipeptid; PKA – protein kinaza A; PVN – paraventrikularna jezgra; RHT – retinohipotalamična regija; SCG – supracervikalni ganglij)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Topikalna primjena, unatoč ograničenoj bioraspoloživosti, glavni je put primjene oftalmičkih lijekova, budući da je zbog jednostavnosti i neinvazivnosti, u odnosu na druge putove oftalmičke primjene, najbolje prihvaćena od bolesnika. Apsorpcija topikalno primijenjenih lijekova značajno je ograničena i regulirana barijerama prednjeg dijela oka poput nazolakrimalne drenaže, refleksa treptanja i suzenja, čvrste barijere rožnice, proteina i metaboličkih enzima suzne tekućine, koji učinkovito odstranjuju topikalno primijenjene oftalmičke pripravke rezultirajući njihovom niskom bioraspoloživošću u oku. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj terapijskih nanosustava za lokalnu oftalmičku primjenu s ciljem produljenja kontakta sustava s površinom oka, kontroliranja kinetike oslobađanja lijeka iz sustava i poboljšanja bioraspoloživosti lijeka u oku.

Razvoj nanotehnologije praćen je razvojem brojnih terapijskih nanosustava koji se razlikuju u materijalu od kojeg su pripremljeni, dizajnu, naboju, veličini te brojnim drugim fizičko-kemijskim svojstvima, o kojima ovisi njihova biokompatibilnost odnosno biofarmaceutska aktivnost u biološkom okruženju.

Kitozan je prirodni polimer koji nastaje deacetilacijom hitina, strukturnog polisaharida beskrležnjaka i nižih biljaka. Njegova povoljna svojstva kao što su biorazgradivost, biokompatibilnost i bioadhezivnost omogućila su mu biomedicinsku primjenu. Do sada su već razvijeni terapijski (nano)sustavi temeljeni na kitozanu za nazalnu, mukoznu, okularnu i transdermalnu primjenu (Paul i Sharma, 2000.).

Melatonin je hormon epifize koji se sintetizira u pinealocitima iz aminokiseline triptofana, nakon čega difuzijom prelazi u kapilarni sustav i cerebrospinalnu tekućinu te brzo dospijeva do svih tkiva i tjelesnih tekućina (Pavić i Zorc, 2013.). Najpoznatiji je kao regulator cirkadijanog i sezonskog bioritma, no ima ulogu i u djelovanju imunog i reproduktivnog sustava, regulaciji tjelesne mase i inhibiciji rasta tumora. Direktno djeluje i kao antioksidans, smanjuje utjecaj kemotoksičnog zračenja te usporava proces starenja (Hardeland i sur., 2011.). Nakon lokalne oftalmičke primjene, melatonin štiti tkiva oka od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima, te regulira povišen intraokularni tlak (Lundmark i sur., 2007.).

U ovom radu pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice kao terapijski sustav namijenjen za oftalmičku primjenu melatonina. Lecitinsko-kitozanske nanočestice izrađene su direktnim injektiranjem etanolne otopine lecitina i melatonina u vodenu otopinu kitozana. Pripravljene nanočestice karakterizirane su s obzirom na sadržaj melatonina, veličinu i zeta-potencijal. Glavni cilj rada bio je ispitati bioadhezivnost pripremljenih nanočestica određivanjem njihovog prijanjanja na konfluentni sloj imortaliziranih stanica humanog epitela rožnice (HCE-T). Određivanje bioadhezivnosti *in vitro* omogućuje procjenu potencijala razvijenog sustava da produlji vrijeme zadržavanja lijeka na mjestu primjene, odnosno poveća bioraspoloživost lijeka u oku.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U izradi ovog diplomskog rada korišten je kitozan klorid (Protasan UP Cl 113, stupanj deacetilacije 86 %, viskoznost 1 % otopine 13 mPa s, NovaMatrix, Norveška), lecitin S45 (lecitin iz soje, 45 % fosfatidilkolina; Lipoid GmbH, Njemačka) i melatonin (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Njemačka). Ostale korištene kemikalije bile su od proizvođača Kemig (Hrvatska). Etanol (96 %) korišten je za pripravu otopina lecitina. Otopina NaCl (10 mM) korištena je za razrjeđivanje suspenzija nanočestica prije mjerenja zeta-potencijala. Pufer balansirani Hankovim solima (engl. *Hank's balanced salt solution*) pH 6,0, pripremljen je otapanjem bezvodnog kalcijevog klorida (CaCl_2 bezvodni; 140 mg l^{-1}), magnezijevog klorida ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 100 mg l^{-1}), magnezijevog sulfata ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 100 mg l^{-1}), kalijevog klorida (KCl; 400 mg l^{-1}), kalijevog dihidrogenfosfata (KH_2PO_4 ; 60 mg l^{-1}), natrijevog bikarbonata (NaHCO_3 ; 350 mg l^{-1}), natrijevog klorida (NaCl; 8000 mg l^{-1}), dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4 bezvodni; 48 mg l^{-1}), D-glukoze (1000 mg l^{-1}) i 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonske kiseline (HEPES; 30 mM) u pročišćenoj vodi.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje melatonina HPLC metodom

Kvantitativno određivanje melatonina provedeno je visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC). Sustav se sastojao od Agilent 1100 Series instrumenta (Agilent Technologies, Njemačka), koji je opremljen s diodnim detektorom ($\lambda = 224 \text{ nm}$). Mobilna faza pripravljena je miješanjem pročišćene vode i acetonitrila u volumnom omjeru 52:48. Brzina protoka mobilne faze iznosila je 1 ml/min. Korištena je kolona (Kinetex C18 kolona $50 \times 4.6 \text{ mm}$, veličina čestice 5 μm , Phenomenex, SAD) opremljena s filterom (KrudKatcher Ultra HPLC, 0.5 μm dubinski filter \times 0,004 inča, Phenomenex, SAD), termostetirana pri temperaturi od 30 °C. Volumen ubrizgavanja uzorka je 10 μl . Vrijeme retencije melatonina iznosilo je 0,6 min.

3.2.2. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Pripravljena je otopina kitozan klorida koncentracije 10 mg l^{-1} u pročišćenoj vodi. Otopina lecitina koncentracije 25 mg ml^{-1} pripravljena je u 96 % etanolu. Za pripravu lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom, melatonin je otopljen u etanolnoj otopini lecitina u koncentraciji od 5 mg ml^{-1} , odnosno u masenom omjeru prema lecitinu od 1:5.

Otopina kitozana (0,25 ml) razrijeđena je pročišćenom vodom do volumena od 23 ml. Suspenzija lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom pripravljena je injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina kroz iglu unutarnjeg promjera 0,75 mm, u 23 ml razrijeđene otopine kitozana uz miješanje na magnetskoj mješalici (900 okr/min). U pripremljenoj suspenziji nanočestica koncentracija kitozana iznosi $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, a maseni omjer lecitina i kitozana 20:1. Usporedbe radi, pripravljene su i lecitinske nanočestice s melatoninom, injektiranjem 2 ml etanolne otopine lecitina i melatonina u 23 ml pročišćene vode. Lecitinsko-kitozanske i lecitinske nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice) pripravljene su opisanim postupcima uz izostavljanje melatonina.

3.2.3. Određivanje uspješnosti uklapanja melatonina u nanočestice

Sadržaj tj. uklopljenost lijeka u nanočestice određen je metodom dijalize koja omogućava odvajanje neuklopljenog lijeka od nanočestica s uklopljenim lijekom. Odgovarajući volumen (4 ml) suspenzije nanočestica s melatoninom stavljen je u vrećicu za dijalizu od celuloza acetata (Spectra/Por®, MW cut-off 12000-14000 Da, Medicell International Ltd, UK). Potom je vrećica za dijalizu uronjena u receptorsku fazu (u 100 ml pročišćene vode). Uz neprekidno miješanje na magnetskoj mješalici (30 okr/min), iz receptorske faze uzimani su uzorci (2 ml) u određenim vremenskim intervalima. Uzeti volumen nadoknađivan je svježom pročišćenom vodom. Uzorci su razrijeđeni s 1 ml pročišćene vode, a onda je određena koncentracija melatonina UV-Vis spektrofotometrom ($\lambda=278 \text{ nm}$) (Cary 50, Varian Inc., SAD).



Slika 10. Dijaliza suspenzije nanočestica: odvajanje neuklopljenog lijeka od nanočestica s uklopljenim lijekom

Ispitivanje je zaustavljeno kada su u uzastopnim uzorcima receptorske faze izmjerene jednake koncentracije lijeka (nakon 120 min).

Uspješnost uklapanja lijeka (UU) određena je prema sljedećoj jednadžbi:

$$UU = ([\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]) / [\text{ukupni lijek}] \times 100$$

Sadržaj melatonina u nanočesticama (engl. *drug loading*, DL(%)) izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$DL (\%) = ([\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]) / [\text{masa nanočestica}] \times 100.$$

Sadržaj melatonina (C_M) u suspenziji nanočestica izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$C_M (\mu\text{gml}^{-1}) = ([\text{ukupni lijek}] - [\text{neuklopljeni lijek}]) / [\text{volumen suspenzije nanočestica}]$$

Dijalizirani uzorci suspenzija nanočestica korišteni su u svim daljnjim ispitivanjima.

3.2.4. Određivanje veličine nanočestica

Veličina nanočestica određena je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (engl. *photon correlation spectroscopy*; PCS; Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). PCS metodom se određuje veličina dispergiranih čestica u području od 2 nm do 3 μm . Mjerenje se provodi obasjavanjem uzorka monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, te se bilježi intenzitet svjetlosti raspršene na česticama pod određenim kutom. Dispergirane čestice se stalno gibaju (Brownovo gibanje) što rezultira stalnim fluktuiranjem intenziteta raspršene svjetlosti tijekom vremena. U mjernim sustavima upotrebljen je monokromatski koherentni 10 mW He-Ne laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$), a kut detekcije raspršene svjetlosti je bio 90° . Mjerenja su provedena pri 25°C . Veličina čestica mjerena je nakon odgovarajućeg razrjeđenja dijaliziranih suspenzija nanočestica pročišćenom vodom.

3.2.5. Određivanje zeta-potencijala nanočestica

Zeta-potencijal određen je fotonskom korelacijskom spektroskopijom (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, UK). Na površini koloidne čestice razlikuje se sloj slabo pokretnih iona uz površinu (Sternov sloj) i sloj pokretnih iona suprotnog naboja iz otapala (difuzijski sloj). Nabijene dispergirane čestice putuju u električnom polju prema suprotno nabijenoj elektrodi (elektroforetska pokretljivost). Zajedno s česticom giba se Sternov sloj i dio vezanih molekula otapala, odijeljen od ostalih molekula otapala plohom smicanja. Potencijal na udaljenosti od plohe smicanja je mjereni elektrokinetički zeta-potencijal (ζ). Vrijednost zeta-potencijala određuje se indirektno mjerenjem elektroforetske pokretljivosti čestica. U sustavu za mjerenje elektroforetske pokretljivosti čestica uporabljen je 10 mW He-Ne laser. U promjenjivom električnom polju nabijene se čestice gibaju i raspršuju laserske zrake. Intenzitet raspršene svjetlosti mijenja se frekvencijom koja ovisi o brzini gibanja čestica. S obzirom na detektirane fotone svjetlosti, proizlazi spektar frekvencija iz kojega se izračunava elektroforetska pokretljivost, odnosno zeta-potencijal. Mjerenja su provedena pri 25°C . Zeta-potencijal nanočestica mjereno je nakon odgovarajućeg razrjeđivanja dijaliziranih suspenzija nanočestica 10 mM otopinom NaCl.

3.2.6. Stanična linija i uvjeti uzgoja

U ovom radu korištene su imortalizirane stanice humanog epitela rožnice (HCE-T; RIKEN Cell Bank, Japan). Stanice su uzgajane u sterilnim uvjetima u tikvicama za uzgoj stanica površine 25, 75 i 150 cm² ili na pločama sa 24 jažice (TPP, Švicarska) pri 37°C, 5% CO₂ i 95% relativne vlažnosti. Konfluentnost je kontrolirana invertnim mikroskopom (Primovert, Carl Zeiss AG, Njemačka). Za uzgoj HCE-T stanica kao hranidbeni medij korišten je DMEM/F12 (Lonza, Švicarska) koji je sadržavao fetalni goveđi serum (5%, Biosera, Francuska), inzulin (5 µgml⁻¹, Applichem, Njemačka), dimetil sulfoksid (0,5%, Applichem), epidermalni faktor rasta (10 ngml⁻¹, Applichem), i Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B (Lonza).

Nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, stanice su presađivane u novu tikvicu. Prilikom presađivanja medij je uklonjen te su stanice isprane fosfatnim puferom (PBS, Lonza). Stanice su potom isprane 0,02 % (m/V) otopinom EDTA (Lonza) te inkubirane s 0,25 % (m/V) otopinom tripsina (Lonza) pri 37°C. Nakon odvajanja stanica od podloge učinak tripsina je inhibiran dodatkom DMEM/F12 medija u volumnom omjeru prema tripsinu 3:2. Stanični medij je mijenjan svaka dva dana.

3.2.7. Ispitivanje bioadhezivnosti nanočestica

Bioadhezivnost nanočestica ispitana je određivanjem prijanjanja nanočestica na konfluentni sloj HCE-T stanica. Opseg bioadhezije čestica procijenjen je mjerenjem smanjenja sadržaja melatonina u suspenziji nanočestica nakon izlaganja staničnog monosloja suspenziji nanočestica s melatoninom. HCE-T stanice nasadene su na ploče sa 24 jažice (TPP, Švicarska) pri gustoći 2×10^4 stanica po jažici nakon čega im je bilo potrebno 2 dana do postizanja odgovarajuće konfluentnosti. Stanice su tretirane s 200 µL lecitinsko-kitozanskih i lecitinskih nanočestica s melatoninom ili odgovarajućom vodenom otopinom melatonina, nakon što je uklonjen stanični medij. U točno određenim vremenskim intervalima (6 vremenskih točaka tijekom 90 minuta) uzimani su uzorci (20 µL) za analizu sadržaja melatonina. Preostali sadržaj suspenzije zatim je prenesen u sljedeću jažicu, nakon što je uklonjen stanični medij. Sakupljeni uzorci razrijeđeni su smjesom vode i acetonitrila u volumnom omjeru 52:48, a sadržaj melatonina određen je HPLC-om.



Slika 11. Ispitivanje bioadhezivnosti nanočestica na konfluentnom monosloju HCE-T stanica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom (MLK) uspješno su pripravljene metodom ionotropnog geliranja kitozana i lecitina. Metoda pripreme uključivala je injektiranje etanolne otopine lecitina i melatonina u vodenu otopinu kitozana uz miješanje, pri čemu su, uslijed ionske interakcije između negativno nabijenog lecitina i pozitivno nabijenog kitozana spontano nastale nanočestice. Odabrana metoda pripreme nanočestica jednostavna je i reproducibilna, a lecitin i kitozan kao prirodne, biokompatibilne i biorazgradljive tvari, prikladni su za razvijanje terapijskih sustava za oftalmičku primjenu lijekova (Bhatta i sur., 2012.).

Maseni omjer lecitina i kitozana iznosio je 20:1, dok je maseni omjer između melatonina i lecitina iznosio 1:5.

Usporedbe radi, pripravljene su i lecitinske nanočestice s melatoninom (ML).

Nanočestice bez melatonina (prazne nanočestice) pripravljene su opisanim postupkom uz izostavljanje melatonina. Prazne lecitinsko-kitozanske nanočestice označene su kao LK. Prazne lecitinske nanočestice označene su oznakom L.

U pripravi nanočestica korišten je kitozan klorid, topljiv u vodi, stupnja deacetilacije 75-90%, o kojem, kao i o pH medija, ovisi gustoća pozitivno nabijenih amino skupina na polimernom lancu. Lecitin, smjesa prirodnih fosfolipida, često se koristi u pripravi različitih terapijskih nanosustava te se smatra sigurnim i biokompatibilnim ekscipijensom, a omogućuje dobro uklapanje lipofilnih lijekova te njihovo produljeno oslobađanje (Bhatta i sur., 2012). Lecitinsko-kitozanske nanočestice s melatoninom pripravljene su s lecitinom Lipoid S45 koji sadrži fosfatidilkolin (54,9%), fosfatidiletanolamin (16,9%), lizofosfatidilkolin (1,0%) te masne kiseline čiji je sadržaj izražen u postotku u odnosu na ukupnu količinu masnih kiselina: palmitinsku (18%), stearinsku (3%), oleinsku (10%), linoleinsku (60%), linolensku (5%); te manji sadržaj triglicerida i DL-R-tokoferola (0,8%). Injektiranjem etanolne otopine lecitina Lipoid S45 u vodeni medij nastaju ionske nanočestice negativnog površinskog naboja, dok injektiranjem u vodenu otopinu kitozana nastaju lecitinsko-kitozanske nanočestice

zahvaljujući ionskoj interakciji između pozitivno nabijenih amino skupina kitozana i negativno nabijenih sastavnica lecitina (Hafner i sur., 2009.).

4.2. Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice

Uspješnost uklapanja melatonina u nanočestice određena je metodom dijalize koja omogućava odjeljivanje neuklopljenog lijeka od nanočestica s uklopljenim lijekom.

Uspješnost uklapanja lijeka (UU) odnosi se na sadržaj lijeka uklopljenog u nanočestice, izražen u postotku prema ukupnoj količini lijeka u pripravku. Iz uspješnosti uklapanja lijeka može se izračunati sadržaj uklopljenog lijeka, tj. postotni udio uklopljenog lijeka u odnosu na ispitivanu količinu nanočestica (DL; Tablica 2), odnosno količina uklopljenog lijeka sadržana u jediničnom volumenu suspenzije nanočestica (koncentracija melatonina u suspenziji nanočestica, C_M ; Tablica 2). Navedeni parametri pripremljenih (suspenzija) lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Uspješnost uklapanja i sadržaj melatonina u pripremljenim nanočesticama

Uzorak	UU (%)	DL (%)	C_M (μgml^{-1})
ML	$24,3 \pm 1,3$	$4,4 \pm 0,2$	$97,1 \pm 5,3$
MLK	$30,1 \pm 1,0$	$5,4 \pm 0,2$	$120,5 \pm 4,0$

UU (%), uspješnost uklapanja: $\text{sadržaj lijeka} / \text{teorijski sadržaj lijeka} \times 100$

DL (%), sadržaj lijeka/ispitivana količina nanočestica $\times 100$

C_M (μgml^{-1}), sadržaj lijeka/volumen suspenzije nanočestica

S obzirom na tip ispitivanog terapijskog sustava, postignut je relativno velik sadržaj lijeka u nanočesticama ($5,4 \pm 0,2$ % za MLK te $4,4 \pm 0,2$ % za ML nanočestice), koji odgovara koncentraciji melatonina u suspenziji nanočestica od $120,5 \pm 4,0$ za MLK te $97,5 \pm 5,3$ μgml^{-1} za ML nanočestice. Uspješnost uklapanja melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice (MLK) bila je veća od uspješnosti uklapanja melatonina u odgovarajuće lecitinske nanočestice (ML), što je u skladu s literaturnim navodima (Hafner i sur., 2009.). Dijalizirane suspenzije nanočestica korištene su u svim drugim ispitivanjima.

4.3. Veličina i zeta-potencijal nanočestica s melatoninom

Veličina i površinski naboj nanočestica s melatoninom određeni su u dijaliziranim sustavima nakon razrjeđenja s vodom odnosno 10 mM otopinom NaCl, kako bi se izbjeglo višestruko raspršivanje svjetlosti uzrokovano velikom koncentracijom nanočestica u uzorku (Hafner, 2008.).

Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Veličina, raspodjela veličina i površinski naboj pripremljenih nanočestica

Uzorak	Srednji promjer (nm)	PDI	Zeta-potencijal (mV)
ML	$94,6 \pm 2,8$	$0,353 \pm 0,003$	$-35,0 \pm 3,9$
L	$82,8 \pm 3,2$	$0,425 \pm 0,012$	$-35,4 \pm 3,5$
MLK	$252,2 \pm 2,7$	$0,272 \pm 0,014$	$24,6 \pm 1,1$
LK	$242,6 \pm 0,9$	$0,260 \pm 0,013$	$24,0 \pm 1,9$

Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD (n = 3).

PDI, indeks polidisperznosti

Srednji promjer lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom iznosio je $252,2 \pm 2,7$ nm. Lecitinske nanočestice s melatoninom bile su srednjeg promjera od $94,6 \pm 2,8$ nm. Značajno veća vrijednost srednjeg promjera čestica u sustavu pripremljenom s lecitinom i kitozanom u usporedbi s lecitinskim nanočesticama upućuje na nastanak lecitinsko-kitozanskih nanočestica (Hafner i sur., 2009.).

Uklapanje melatonina rezultiralo je blagim porastom promjera lecitinsko-kitozanskih nanočestica. Isto opažanje objavljeno je već u literaturi za nanočestice s melatoninom pripremljene s lecitinom Lipoid S45 i kitozanom tipa C113 (Hafner i sur., 2009.).

Pripremljene suspenzije nanočestica karakterizirane su relativno širokom raspodjelom veličina čestica (posebice lecitinskih nanočestica) na što ukazuju vrijednosti indeksa polidisperznosti prikazane u Tablici 3. Slična polidisperznost nanočestica pripremljenih s

kitozanom ili derivatima kitozana često se navodi u literaturi. Kitozan, kao prirodni polimer, smjesa je lanaca različite molekulske mase iz kojih nastaju nanočestice šireg raspona veličina (Hafner, 2008.).

Površinski naboj nanočestica važno je svojstvo o kojem ovisi biokompatibilnost odnosno bioadhezivnost nanočestica. Zeta-potencijal lecitinskih i lecitinsko-kitozanskih nanočestica prikazan je u Tablici 3. Vrijednosti zeta-potencijala promijenile su se od negativnih za koloidnu suspenziju lecitina ($-35,0 \pm 3,9$ i $-35,4 \pm 3,5$ mV redom za ML i L nanočestice) u pozitivne, za lecitinsko-kitozanske nanočestice. To upućuje na prisustvo pozitivno nabijenih amino skupina kitozana na njihovoj površini. Naime, kitozan je pozitivno nabijen u otopinama pri pH vrijednostima ispod pKa kitozana ($\sim 6,5$). Kako se pH sustava približava pKa vrijednosti kitozana, smanjuje se broj ioniziranih amino skupina kitozana (Sonvico i sur., 2006.).

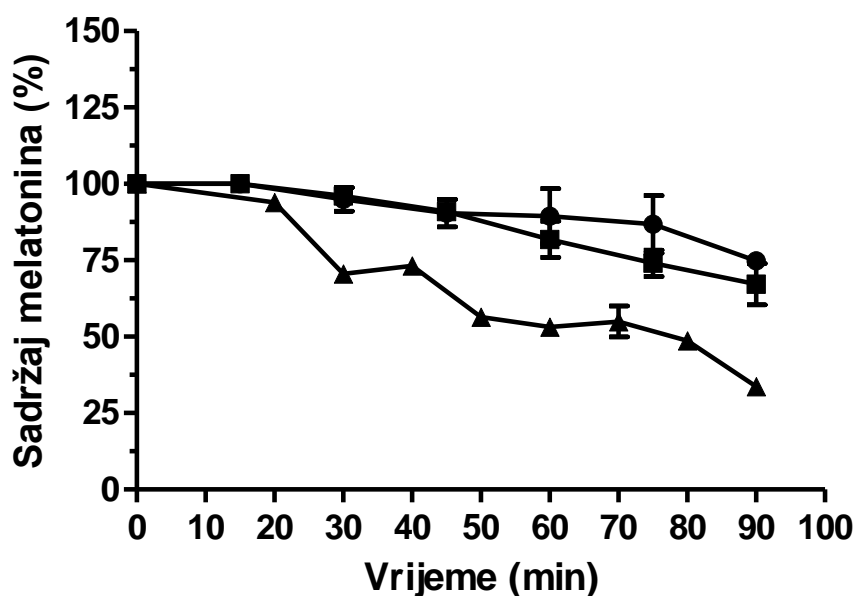
Zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom nije se značajnije razlikovao od zeta-potencijala odgovarajućih praznih nanočestica, iz čega se može zaključiti da uklapanje melatonina nije utjecalo na površinski naboj nanočestica, odnosno da je melatonin uklopljen u lecitinsku jezgru nanočestica.

Pripravljene lecitinsko-kitozanske nanočestice karakterizirane su relativno velikim površinskim nabojem, što je od iznimne važnosti za stabilnost pripremljenih suspenzija. Naime, nanočestice zeta-potencijala većeg od približno 30 mV ne podliježu agregaciji zbog izraženog električnog odbijanja (Heurtault i sur., 2003.).

4.4. Bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica

Terapijskim sustavima čiji cilj je produljiti vrijeme zadržavanja lijeka na površini oka potrebno je odrediti bioadhezivna svojstva (Musumeci i sur., 2013.). U ovom radu, bioadhezivnost nanočestica određena je praćenjem prijanjanja nanočestica na konfluentni monosloj HCE-T stanica. Melatonin uklopljen u nanočestice poslužio je kao pokazatelj obima bioadhezije nanočestica. Otopina melatonina korištena je kao kontrola, s obzirom da bi se eventualno smanjenje sadržaja melatonina u otopini kojoj je izložen monosloj HCE-T stanica moglo pripisati apsorpciji melatonina. Praćenje promjene koncentracije melatonina u takvom kontrolnom uzorku omogućuje razlikovanje smanjenja sadržaja melatonina u suspenziji nanočestica koje je posljedica apsorpcije od onog uzrokovanog bioadhezijom nanočestica.

Suspenzije nanočestica (i otopina melatonina) razrijeđivane su HBSS-om (pH 6,0) prije tretiranja HCE-T stanica, kako bi se osigurala pH vrijednost pri kojoj su čestice stabilne i kitozan pozitivno nabijen. Smanjenje sadržaja melatonina u suspenzijama lecitinskih (ML) i lecitinsko-kitozanskih nanočestica (MLK) nakon izlaganja konfluentnog monosloja HCE-T stanica spomenutim suspenzijama prikazano je na slici 1. Prikazani rezultati potvrđuju značajno veću bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica (MLK) u odnosu na lecitinske nanočestice (ML), što je u skladu s izmjerenim zeta-potencijalom uspoređenih nanočestica. MLK nanočestice karakterizirane su pozitivnim površinskim nabojem, zahvaljujući prisustvu pozitivno nabijenih amino skupina kitozana na površini nanočestica, dok su ML nanočestice negativno nabijene (Tablica 3).



Slika 12. Bioadhezivnost lecitinskih (ML; ■) i lecitinsko-kitozanskih nanočestica (MLK; ▲) izražena kroz smanjenje sadržaja melatonina u suspenzijama nanočestica nakon izlaganja konfluentnog monosloja HCE-T stanica navedenim suspenzijama. Vodena otopina melatonina (●) korištena je kao kontrola. Prikazane su srednje vrijednosti \pm SD ($n = 3$).

Ovisnost bioadhezivnosti o površinskom zeta-potencijalu na primjeru kitozanskih mikrosfera pokazali su već He i suradnici (1998.). Bioadhezivnost mikrosfera određena je mjerenjem adsorbirane količine mucina na kitozanskim mikrosferama. Utvrđeno je da je adsorpcija mucina bila to veća što je zeta-potencijal na površini mikrosfera bio pozitivniji, a

"zeta-potencijal" glikoproteina mucina negativniji. Svi čimbenici koji su utjecali na smanjenje površinskog zeta-potencijala (umrežavanje kitozana, razlike u količini sijalinske kiseline u različitim tipovima mucina, promjena pH i ionske jakosti medija) uzrokovali su i smanjenje adsorpcije mucina na kitozanske mikrosfere.

Rezultati vezani uz bioadhezivnost MLK i ML nanočestica dobiveni metodom razvijenom u ovom radu u skladu su s rezultatima dobivenim primjenom standardne metode ispitivanja bioadhezivnih svojstava (nano)čestica koja se temelji na mjerenju količine mucina koja se adsorbirala na nanočestice suspendirane u vodenoj otopini mucina pri pH 6,0 (Hafner i sur., 2009.). Nedostatak u ovom radu razvijene metode određivanja bioadhezivnosti nanočestica je nemogućnost kvantitativnog razlučivanja količine nanočestica koja je adsorbirana na monosloj stanica od količine internaliziranih nanočestica. Ipak, razvijena metoda može poslužiti u procjeni bioadhezivnih svojstava nanočestica, s obzirom da bioadhezija prethodi procesu endocitoze. Poznato je da negativno nabijene i neutralne čestice pokazuju mali afinitet stupanja u interakciju sa staničnom membranom, dok pozitivno nabijene čestice imaju velik afinitet vezanja za staničnu membranu (Verma i Stellacci, 2010.). Bilo je dokaza o unosu negativno nabijenih čestica u stanicu usprkos nepovoljnoj interakciji s negativno nabijenom staničnom membranom. Suprotno slaboj interakciji i internalizaciji neutralnih i negativno nabijenih čestica u stanicu, pozitivno nabijene čestice rado se vežu za negativno nabijene skupine na površini stanice te se internaliziraju preko stanične membrane.

Usto, negativno nabijene lecitinske nanočestice (ML; $94,6 \pm 2,8$ nm), koje su predstavljale svojevrsnu kontrolu pri određivanju bioadhezivnosti lecitinsko-kitozanskih nanočestica, imale su značajno manji srednji promjer od lecitinsko-kitozanskih nanočestica (MLK; $252,2 \pm 2,7$ nm). Uzimajući u obzir njihovu veličinu, lecitinske nanočestice bile su podložnije endocitozi u odnosu na lecitinsko-kitozanske nanočestice.

5. ZAKLJUČCI

- Lecitinsko-kitozanske nanočestice srednjeg promjera od $252,2 \pm 2,7$ nm, pozitivnog zeta-potencijala ($24,6 \pm 1,1$ mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ($5,4 \pm 0,2$ %) uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana.
- Srednji promjer lecitinsko-kitozanskih nanočestica veći je od promjera odgovarajućih lecitinskih nanočestica. Usto, zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica je pozitivan a zeta-potencijal lecitinskih nanočestica je negativan, što potvrđuje interakciju kitozana i lecitina.
- Uspješnost uklapanja melatonina u lecitinsko-kitozanske nanočestice je veća od uspješnosti uklapanja melatonina u odgovarajuće lecitinske nanočestice.
- Zeta-potencijal lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom nije se značajnije razlikovao od zeta-potencijala odgovarajućih praznih nanočestica, što znači da uklapanje melatonina nije utjecalo na površinski naboj nanočestica, odnosno da je melatonin uklopljen u lecitinsku jezgru nanočestica.
- Bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom je značajno veća od bioadhezivnosti lecitinskih nanočestica, što ukazuje na potencijalno dulje zadržavanje lecitinsko-kitozanskih nanočestica u prekornealnom području, odnosno veću bioraspoloživost uklopljenog melatonina i bolji terapijski učinak na povišeni intraokularni tlak.

6. LITERATURA

A synopsis of Parkinson's disease/Melatonin in Parkinson's disease, 2014., <http://www.intechopen.com>, pristupljeno 15.5.2015.

Agorastos A, Huber CG. The role of melatonin in glaucoma: implications concerning pathophysiological relevance and therapeutic potential. *J Pineal Res*, 2011, 50, 1–7.

Ahmed I, Patton TF. Disposition of timolol and inulin in the rabbit eye following corneal versus non-corneal absorption. *Int J.Pharm*, 1987, 38, 9–21.

Alcantara-Contreras S, Baba K, Tosini G. Removal of MEL receptor type 1 increases intraocular pressure and retinal ganglion cells death in the mouse. *Neurosci Lett*, 2011, 494, 61–64.

Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Lobo JM. In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discov Today*, 2014, 19(4):400-12.

Alonso MJ, Sanchez A, Nanoparticulate Carriers for Ocular Drug Delivery. U: Nanoparticulates as drug carriers. Torchilin VP, urednik, London, Imperial College Press, 2006, str. 120-134.

Alonso MJ, Sanchez A. The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55, 1451–1463.

Belforte NA, Moreno MC, de Zavalía N, Sande PH, Chianelli MS, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *J Pineal Res*, 2010, 48, 353-364.

Bhatta RS, Chandasana H, Chhonker YS, Rathi C, Kumar D, Mitra K, Shukla PK. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: *In vitro* and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm*, 2012, 432, 105-112.

Bucolo C, Salomone S, Drago F. Pharmacological management of ocular hypertension: current approaches and future prospective. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13, 50–55.

C. Le Boultais L, Acar H, Zia PA, Sado T, Needham R. Ophthalmic drug delivery systems — recent advances. *Progr Retin Eye Res*, 1998, 17, 33–58.

Cao Y, Zhang C, Shen W, Cheng Z, Yu L, Ping Q. Poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive in situ gel-forming system for ocular drug delivery. *J Control Release*, 2007, 120, 186–194.

Chowdhury I, Sengupta A, Maitra SK, Indian J. Melatonin Synthesis. *Biochem Biophys*, 2008, 45, 289.

De la Fuente M, Raviña M, Paolicelli P, Sanchez A, Seijo A, Jose Alonso M. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62, 100–117.

Del Amo EM, Urtti A. Current and future ophthalmic drug delivery systems, A shift to the posterior segment. *Drug Discov Today*, 2008, 13, 135–143.

Del Amo EM, Urtti A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. *Drug Discov Today*, 2008, 13, 135–143.

Duvvuri S, Majumdar S, Mitra AK, Role of metabolism in ocular drug delivery. *Curr Drug Metab*, 2004, 5, 507–515.

Ehrhardt C, Kim KJ. The conjunctival barrier in ocular drug delivery. U: Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, Melgardt M. de Villiers, Pornanong Aramwit, Glen S. Kwon, urednici, Dublin, Springer, 2008, str. 307–320.

Felt O, Furrer P, Mayer JM, Plazonnet B, Buri P, Gurny R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *Int J Pharm*, 1999, 180, 185–193.

Ghate D, Edelhauser HF. Ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3, 275–287.

Giannavola C, Bucolo C, Maltese A, Paolino D, Vandelli MA, Puglisi G, Lee VHL, Fresta M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded nanospheres, *Pharm Res*, 2003, 20, 584–590.

Gurny R. Preliminary study of prolonged acting drug delivery systems for the treatment of glaucoma. *Pharm Acta Helv*, 1981, 56, 130–132.

- Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 190.
- Hafner A, Lecitinsko-kitozanske nanočestice za nazalnu i (trans)dermalnu primjenu melatonina, Doktorski rad, Zagreb, 2008.
- Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009, 381, 205–213.
- Hämäläinen KM, Kananen K, Auriola S, Kontturi K, Urtti A. Characterization of paracellular and aqueous penetration routes in cornea, conjunctiva, and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38, 627-634.
- Hardeland R. Melatonin-A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*, 2011, 93, 350-384.
- He P, Davis SS, Illum L. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm*, 1998, 166, 75-88.
- Heurtault P, Saulnier B, Pech JE, Proust, Benoi JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 2003, 23, 283-300.
- Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and their regulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60, 227–240.
- Hsiue GH, Hsu SH, Yang CC, Lee SH, Yang IK. Preparation of controlled releaseophthalmic drops. *Biomaterials* 2002, 23, 457–462.
- Illum L. Chitosan and It's Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharm Res*, 1998, 15, 1326-1331.
- Jarvinen K, Jarvinen T, Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16, 3–19.
- Jiang W, Kim BJS, Rutka JT, Chan WCW. *Nat Nanotechnol*, 2008, 3, 145.
- Kas HS. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate sysrems. *J Microencapsul*, 1997, 14, 689-711.

- Kaur IP, Kanwar M. Ocular preparations: the formulation approach. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28, 473-493.
- Lundmark PO, Pandi-perumal SR, Srinivasan V. Melatonin in the eye: implications for glaucoma. *Exp Eye Res*, 2007, 84, 1021–1030.
- Mucha M. Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions, *Macromol Chem Phys*, 1997, 198, 471–484.
- Nemesure B, Honkanen R, Hennis A. Incident open-angle glaucoma and intraocular pressure. *Ophthalmology*, 2007, 114, 954-959.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal. *FEBS J*, 2006, 273, 2813.
- Paul W, Sharma CP. Chitosan, a drug carrier for the 21st century, *S T P Pharm Sci*, 2000, 10, 5-22.
- Pavić K, Zorc B. Melatonin, *FG*, 2013, 69, 249-265.
- Pepić I, Hafner A, Lovrić J, Filipović-Grčić J. Stražnji dio oka – bolesti, barijere, terapijski sustavi. *FG*, 2012, 68, 255-277.
- Pepić I, Kaić N, Filipović-Grčić J. Nanočestice kao terapijski sustavi za primjenu lijeka u oko. *FG*, 2011, 67, 73-86.
- Pepić I. Nanosustavi poloksamera 407 i kitozana za oftalmičku primjenu. Doktorski rad, Zagreb, 2009.
- Pignatello R, Bucolo C, Spedalieri G, Maltese A, Puglisi G. Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application. *Biomaterials*, 2002, 23, 3247–3255.
- Rosi NL, Giljohann DA, Thaxton CS, Lytton-Jean AKR, Han MS, Mirkin CA. Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation, *Science*, 2006, 312, 1027.
- Sanford PA. Chitosan and alginate: new forms of commercial interest. *Amer Chem Soc Div Polym Chem*, 1990, 31, 628-632.

Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate JA, DeBoer AG, Varum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs: mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res*, 1997, 14, 923–929.

Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical Research*, 2004, 21, 43–49.

Smith, J, Dornish M, Wood E. Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption. *Biomaterials*, 2005, 26, 3269–3276.

Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *Int J Pharm*, 2006, 324, 67–73.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, Mayo JC, Fuentes-Brptp L, Reiter RJ. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev*, 2010, 85, 607.

Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58, 1131–1135.

Verma A, Stellacci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions, *Small*, 2009, No. x, 1–10

Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 2010, 6, 12–21.

Verma A, Uzun O, Hu YH, Hu Y, Han HS, Watson N, Chen SL, Irvine DJ, Stellacci F. *Nat Mater*, 2008, 7, 588.

Wang W, Xu D. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *Int J Biol Macromol*, 1994, 16, 149–152.

7. SAŽETAK

Topikalna primjena glavni je put primjene oftalmičkih lijekova, budući da je zbog jednostavnosti i neinvazivnosti najbolje prihvaćena od bolesnika. Istodobno, barijere prednjeg segmenta oka ograničavaju vrijeme zadržavanja pripravka na površini oka te brzinu i obim apsorpcije, rezultirajući malom bioraspoloživošću lijeka u oku. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj terapijskih nanosustava za topikalnu oftalmičku primjenu s ciljem produljenja kontakta sustava s površinom oka, kontroliranja kinetike oslobađanja lijeka iz sustava i poboljšanja bioraspoloživosti lijeka u oku.

U ovom radu pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice kao terapijski sustav namijenjen za oftalmičku primjenu melatonina. Melatonin je hormon epifize kojemu je jedna od brojnih funkcija i sniženje povišenog očnog tlaka. Cilj ovog rada bio je ispitati bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom *in vitro*, odnosno procijeniti njihov potencijal da produlje vrijeme zadržavanja melatonina u prekornealnom području i osiguraju njegovu veću bioraspoloživost u oku. Lecitinsko-kitozanske nanočestice srednjeg promjera od $252,2 \pm 2,7$ nm, pozitivnog zeta-potencijala ($24,6 \pm 1,1$ mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ($5,4 \pm 0,2$ %) uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana. Srednji promjer lecitinskih nanočestica bio je značajno manji ($94,6 \pm 2,8$ nm) od promjera odgovarajućih lecitinsko-kitozanskih nanočestica, dok im je zeta-potencijal bio negativan ($-35,0 \pm 3,9$ mV). Bioadhezivnost nanočestica ispitana je određivanjem njihovog prijanjanja na konfluentni sloj imortaliziranih stanica humanog epitela rožnice (HCE-T). Uočena je znatno veća bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom u odnosu na bioadhezivnost lecitinskih nanočestica, koja proizlazi iz razlike u njihovom površinskom naboju. Dobiveni rezultati podupiru potencijalnu topikalnu oftalmičku primjenu lecitinsko-kitozanskih nanočestica kao nosača melatonina s ciljem osiguranja veće bioraspoloživosti melatonina u oku i boljeg terapijskog učinka na povišeni očni tlak.

8. SUMMARY

Ophthalmic drugs are mostly applied by topical route of administration, since, being simple and non-invasive, it represents the most convenient route for the patients. However, barriers of the anterior segment of the eye limit the retention time of the formulation at the surface of the eye, as well as the rate and extent of absorption, resulting in low eye-related drug bioavailability. Current investigations are focused on the development of ophthalmic drug delivery systems for topical administration, with the aim to ensure prolonged drug contact with the surface of the eye, controlled drug release kinetics and improved eye-related bioavailability.

In this study, lecithin/chitosan nanoparticles as ophthalmic delivery system for melatonin topical administration were prepared. Melatonin is pineal hormone with pleiotropic effects among which is the regulation of increased intraocular pressure. The aim of this study was to investigate bioadhesion of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles *in vitro*, in order to assess their potential to prolong melatonin retention time at the precorneal area and to ensure melatonin improved eye-related bioavailability. Lecithin/chitosan nanoparticles with mean diameter of 252.2 ± 2.7 nm, positive zeta potential (24.6 ± 1.1 mV) and appropriate melatonin content (5.4 ± 0.2 %) were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Mean diameter of lecithin nanoparticles was significantly lower (94.6 ± 2.8 nm) than the mean diameter of corresponding lecithin/chitosan nanoparticles, and their zeta potential was negative (-35.0 ± 3.9 mV). Bioadhesion of nanoparticles was assessed by monitoring their adhesion to confluent monolayer of immortalised human corneal epithelial cells (HCE-T). Significantly higher extent of bioadhesion was observed in case of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles compared to lecithin nanoparticles, which was ascribed to the difference in their surface charge. The results obtained support the potential topical ophthalmic administration of lecithin/chitosan nanoparticles as melatonin nanocarriers, with the aim to ensure improved eye-related melatonin bioavailability and improved regulation of increased intraocular pressure.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje bioadhezivnosti lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom

Maja Brkić

SAŽETAK

Topikalna primjena glavni je put primjene oftalmičkih lijekova, budući da je zbog jednostavnosti i neinvazivnosti najbolje prihvaćena od bolesnika. Istodobno, barijere prednjeg segmenta oka ograničavaju vrijeme zadržavanja pripravka na površini oka te brzinu i obim apsorpcije, rezultirajući malom bioraspoloživošću lijeka u oku. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj terapijskih nanosustava za topikalnu oftalmičku primjenu s ciljem produljenja kontakta sustava s površinom oka, kontroliranja kinetike oslobađanja lijeka iz sustava i poboljšanja bioraspoloživosti lijeka u oku.

U ovom radu pripravljene su lecitinsko-kitozanske nanočestice kao terapijski sustav namijenjen za oftalmičku primjenu melatonina. Melatonin je hormon epifize kojemu je jedna od brojnih funkcija i sniženje povišenog očnog tlaka. Cilj ovog rada bio je ispitati bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom *in vitro*, odnosno procijeniti njihov potencijal da produlje vrijeme zadržavanja melatonina u prekornealnom području i osiguraju njegovu veću bioraspoloživost u oku. Lecitinsko-kitozanske nanočestice srednjeg promjera od $252,2 \pm 2,7$ nm, pozitivnog zeta-potencijala ($24,6 \pm 1,1$ mV) te zadovoljavajućeg sadržaja melatonina ($5,4 \pm 0,2$ %) uspješno su pripravljene ionskom interakcijom lecitina i kitozana. Srednji promjer lecitinskih nanočestica bio je značajno manji ($94,6 \pm 2,8$ nm) od promjera odgovarajućih lecitinsko-kitozanskih nanočestica, dok im je zeta-potencijal bio negativan ($-35,0 \pm 3,9$ mV). Bioadhezivnost nanočestica ispitana je određivanjem njihovog prijanjanja na konfluentni sloj imortaliziranih stanica humanog epitela rožnice (HCE-T). Uočena je znatno veća bioadhezivnost lecitinsko-kitozanskih nanočestica s melatoninom u odnosu na bioadhezivnost lecitinskih nanočestica, koja proizlazi iz razlike u njihovom površinskom naboju. Dobiveni rezultati podupiru potencijalnu topikalnu oftalmičku primjenu lecitinsko-kitozanskih nanočestica kao nosača melatonina s ciljem osiguranja veće bioraspoloživosti melatonina u oku i boljeg terapijskog učinka na povišeni očni tlak.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 12 grafičkih prikaza, 3 tablice i 64 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kitozan, melatonin, lecitin, bioadhezivnost, nanočestice, oftalmička primjena

Mentor: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Hafner**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Jasmina Lovrić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Evaluation of bioadhesive properties of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles

Maja Brkić

SUMMARY

Ophthalmic drugs are mostly applied by topical route of administration, since, being simple and non-invasive, it represents the most convenient route for the patients. However, barriers of the anterior segment of the eye limit the retention time of the formulation at the surface of the eye, as well as the rate and extent of absorption, resulting in low eye-related drug bioavailability. Current investigations are focused on the development of ophthalmic drug delivery systems for topical administration, with the aim to ensure prolonged drug contact with the surface of the eye, controlled drug release kinetics and improved eye-related bioavailability.

In this study, lecithin/chitosan nanoparticles as ophthalmic delivery system for melatonin topical administration were prepared. Melatonin is pineal hormone with pleiotropic effects among which is the regulation of increased intraocular pressure. The aim of this study was to investigate bioadhesion of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles *in vitro*, in order to assess their potential to prolong melatonin retention time at the precorneal area and to ensure melatonin improved eye-related bioavailability. Lecithin/chitosan nanoparticles with mean diameter of 252.2 ± 2.7 nm, positive zeta potential (24.6 ± 1.1 mV) and appropriate melatonin content (5.4 ± 0.2 %) were successfully prepared by ionic interaction between lecithin and chitosan. Mean diameter of lecithin nanoparticles was significantly lower (94.6 ± 2.8 nm) than the mean diameter of corresponding lecithin/chitosan nanoparticles, and their zeta potential was negative (-35.0 ± 3.9 mV). Bioadhesion of nanoparticles was assessed by monitoring their adhesion to confluent monolayer of immortalised human corneal epithelial cells (HCE-T). Significantly higher extent of bioadhesion was observed in case of melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles compared to lecithin nanoparticles, which was ascribed to the difference in their surface charge. The results obtained support the potential topical ophthalmic administration of lecithin/chitosan nanoparticles as melatonin nanocarriers, with the aim to ensure improved eye-related melatonin bioavailability and improved regulation of increased intraocular pressure.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 12 figures, 3 tables and 64 references. Original is in Croatian language.

Keywords: chitosan, melatonin, lecithin, bioadhesion, nanoparticles, ocular delivery

Mentor: **Anita Hafner, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Hafner, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Jasmina Lovrić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dubravka Vitali Čepo, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.

